

Die Nicotinamid-, Thymin- und Uracilkonzentration im Leichenblut

**Ein Baustein zur Todeszeitschätzung bei fortgeschrittener
Leichenliegezeit ?**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Juliane Schelhorn
geboren am 10. 05. 1979 in Jena

Gutachter

1. PD Dr. Demme
2. Prof. Dr. Winnefeld
3. Prof. Dr. Krause

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2004

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| α | ... Signifikanzniveau bzw. Fehler 1. Art |
| AMP | ... Adenosinmonophosphat |
| ADP | ... Adenosindiphosphat |
| ATP | ... Adenosintriphosphat |
| ^{14}C | ... Kohlenstoff mit Nukleonenzahl 14 |
| CM | ... Fließmittellösung aus Chloroform und Methanol |
| d | ... Schichtdicke (in cm) |
| DC-Platte | ... Dünnschichtchromatographie-Platte |
| DNA | ... Desoxyribonukleinsäure |
| EMA | ... Fließmittellösung aus Ethylacetat, Methanol und Ammoniak |
| FSU Jena | ... Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| g | ... Erdbeschleunigung = $9,807 \text{ m/s}^2$ |
| GK | ... Glaskörperflüssigkeit |
| h | ... Stunde |
| h p.m. | ... Stunden postmortem |
| Konz. | ... Konzentration |
| [Stoff X] | ... Konzentration des Stoffes X |
| [Zahl1, Zahl2] | ... Menge an natürlichen Zahlen n mit Zahl 1 \leq n \leq Zahl 2 |
| λ | ... Wellenlänge Lambda (in nm) |
| MW | ... Mittelwert |
| min | ... Minuten |

| | |
|----------------------|---|
| N | ... Stichprobenumfang |
| N _{ges} | ... gesamter Stichprobenumfang |
| NAD(P) | ... Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) |
| n | ... natürliche Zahl |
| p | ... Irrtumswahrscheinlichkeit |
| pH | ... pH-Wert |
| p.m. | ... postmortem |
| PMI | ... postmortales Intervall |
| SD | ... Standardabweichung |
| r _s | ... Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman |
| r _p | ... Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach Pearson |
| R _F -Wert | ... relative Laufhöhe (englisch: relate to front); R _F -Wert = (Laufhöhe der Substanz) / (Laufhöhe des Laufmittels) |
| R ² | ... Bestimmtheitsmaß |
| RNA | ... Ribonukleinsäure |
| t-RNA | ... Transfer-Ribonukleinsäure |
| UV-Licht | ... ultraviolettes Licht |
| V | ... Volumen |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 9 |
| 1.1 | Problemstellung und aktueller Wissensstand | 9 |
| 1.1.1 | Todeszeitbestimmung nach HENßGE | 9 |
| 1.1.2 | Temperaturorientierte Todeszeitbestimmung | 11 |
| 1.1.3 | Biochemische Methoden der Todeszeitbestimmung | 13 |
| 1.2 | Zielstellung | 14 |
| 1.2.1 | Aufgabenstellungen | 15 |
| 2 | Untersuchungsmaterial und Methodik | 17 |
| 2.1 | Biologisches Untersuchungsmaterial | 17 |
| 2.1.1 | Probandenblute | 17 |
| 2.1.2 | Leichenblute | 17 |
| 2.1.3 | Glaskörperflüssigkeit | 18 |
| 2.2 | Geräte und Chemikalien | 18 |
| 2.2.1 | Geräte und Verbrauchsmaterialien | 18 |
| 2.2.2 | Chemikalien | 19 |
| 2.3 | Methodik | 21 |
| 2.3.1 | Identifikation der Markersubstanzen | 21 |
| 2.3.2 | Isolation und Quantifizierung der Markersubstanzen | 21 |
| 2.3.3 | Statistik | 23 |
| 3 | Versuchsdurchführung und Ergebnisse | 25 |
| 3.1 | Identifizierung der Markersubstanzen | 25 |
| 3.2 | Entwicklung der Analysenmethode | 28 |
| 3.2.1 | Extrahierbarkeit | 28 |

| | | |
|--|--|----|
| 3.2.2 | Methodenbeschreibung | 32 |
| 3.3 | Untersuchung des biologischen Materials | 38 |
| 3.3.1 | Glaskörperflüssigkeit als Untersuchungsmaterial | 38 |
| 3.3.2 | Untersuchung des Einfriervorganges an Probandenbluten | 39 |
| 3.3.3 | Stabilität des biologischen Materials..... | 40 |
| 3.3.4 | Untersuchung der Leichenblute mit bekanntem PMI..... | 41 |
| 4 | Diskussion | 51 |
| 4.1 | Zur Entwicklung der Analysenmethode | 51 |
| 4.2 | Diskussion zur Untersuchung des biologischen Materials | 54 |
| 4.2.1 | Glaskörperflüssigkeit als Untersuchungsmaterial..... | 54 |
| 4.2.2 | Lagerungsfähigkeit des Blutes | 57 |
| 4.2.3 | Probandenblut | 59 |
| 4.2.4 | Eignung der Markersubstanzen zur Eingrenzung des PMI..... | 61 |
| 5 | Schlussfolgerungen | 65 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 67 |
| 7 | Anhang | 76 |
| 7.1 | Tabellen | 76 |
| 7.1.1 | Stabilität der Markersubstanzen bei – 20°C | 76 |
| 7.1.2 | Markersubstanzkonzentrationen in Probandenbluten | 78 |
| 7.1.3 | Markersubstanzkonzentrationen in Leichenbluten | 79 |
| 7.2 | Probandenblute bei unterschiedlicher Lagerung | 82 |
| 7.3 | Leichenblut bei Raumtemperatur..... | 84 |
| 7.4 | Bestimmung der Nachweisgrenzen | 89 |
| Danksagung, Lebenslauf, Ehrenwörtliche Erklärung | | |

Zusammenfassung

Die Bestimmung der Leichenliegezeit stellt nach wie vor eine schwierige Aufgabe dar. Trotz intensiver Forschung ist sie bis heute nicht mit der gewünschten Sicherheit und Genauigkeit durchzuführen. Zur Ermittlung des postmortalen Intervalls (PMI) bedient man sich dabei besonders der Leichenabkühlung, des Rigors, der Livores, der supravitalen elektrischen Erregbarkeit der mimischen Muskulatur, der supravitalen mechanischen Erregbarkeit der Skelettmuskulatur und der supravitalen Erregbarkeit der Iris durch Pharmaka.

Bei toxikologisch-chemischen Untersuchungen an Leichenblut im Rechtsmedizinischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena fielen regelmäßig drei zunächst unbekannte Substanzen auf. Interessanterweise waren diese Substanzen bei Untersuchungen an Blut von Lebenden und an Material schon stark zersetzter Leichen nicht aufgefallen. Ziel dieser Arbeit war es, diese Stoffe zu identifizieren und zu quantifizieren sowie zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Substanzkonzentrationen und dem PMI existiert, der gegebenenfalls zur Bestimmung der Leichenliegezeit beitragen könnte.

Die unbekannten Substanzen identifizierten wir als Nicotinamid, Thymin und Uracil. Eine Methode zur ihrer Konzentrationsbestimmung wurde entwickelt. Hierbei erfolgte die Isolierung aus dem biologischen Material mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, die Quantifizierung mittels Dünnschichtchromatographie und Densitometrie.

Herzblut von 69 Leichen mit bekannter Sterbestunde aus dem Rechtsmedizinischen und dem Pathologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena und aus dem Rechtsmedizinischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München standen für die Untersuchung zur Verfügung. Aufgrund der Probenakquirierung aus unterschiedlichen Instituten konnte das Blut nicht sofort nach der Entnahme untersucht werden. Die Lagerung erfolgte deswegen bei -20°C .

Um zu prüfen, wie sich die Lagerung bei -20°C auswirkt, wurden Probandenblute untersucht. In fünf sofort nach der Entnahme untersuchten Probandenbluten war keine der drei Substanzen nachweisbar. In 17 Probandenbluten, die

erst nach Lagerung bei -20°C untersucht wurden, konnte in 15 Fällen Nicotinamid nachgewiesen werden (mittlere Nicotinamidkonzentration: $2,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ Blut; Konzentrationsbereich: $0,0 - 4,2\text{ }\mu\text{g/ml}$). Thymin und Uracil waren nicht nachweisbar. Durch das Tieffrieren auf -20°C kam es somit zu einer signifikanten Erhöhung der Nicotinamidkonzentration ($p = 0,000$).

Das postmortale Intervall der untersuchten 69 Leichenblute reichte von 10,25 bis 202,00 h. Es fanden sich Nicotinamidkonzentrationen von $0,0 - 22,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ Blut, Thyminkonzentrationen von $0,0 - 7,8\text{ }\mu\text{g/ml}$ und Uracilkonzentrationen von $1,7 - 167,7\text{ }\mu\text{g/ml}$. Mit einfacher und multipler linearer Regressionsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen den Substanzkonzentrationen und der Leichenliegezeit untersucht. Für Nicotinamid ergab sich die Regressionsgleichung $\text{PMI (in h)} = 0,95 * [\text{Nicotinamid}] + 44,3$ ($R^2 = 0,010$). Für Thymin berechnete sich das PMI aus der Gleichung $\text{PMI (in h)} = 8,79 * [\text{Thymin}] + 47,5$ ($R^2 = 0,137$). Die Gleichung mit Uracil lautete $\text{PMI (in h)} = 0,27 * [\text{Uracil}] + 47,0$ ($R^2 = 0,056$). Das Ergebnis der multiplen linearen Regressionsanalyse entsprach exakt dem der einfachen linearen Regressionsanalyse von Thymin.

An den geringen Beträgen der Bestimmtheitsmaße ist zu erkennen, dass der Zusammenhang zwischen den untersuchten Substanzkonzentrationen und dem PMI nur schwach ist. Das liegt daran, dass neben dem PMI auch viele andere Faktoren die Konzentration der untersuchten Substanzen beeinflussen. In Arbeiten zu diesem Thema konnten z. B. die Umgebungstemperatur und das Lebensalter als solche Faktoren aufgezeigt werden. Anhand der eigenen Untersuchung an Probandenbluten wurde darüber hinaus der Einfluss des Tieffrierens auf die Nicotinamidkonzentration erkennbar.

Aus unseren Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Konzentrationsbestimmung von Nicotinamid, Thymin und Uracil nicht zur Eingrenzung der Leichenliegezeit eignet. Die von PROKOP 1966 getroffene Feststellung, dass „chemische Untersuchungen, die den Grad der Dekomposition an bestimmten Abbauprodukten ... fassen wollen, von vornherein zum Scheitern verurteilt“ sind, hat sich bezüglich der von uns untersuchten Substanzen bestätigt.

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und aktueller Wissensstand

Bei jeder Leichenschau wird vom Arzt gefordert, dass er neben der sicheren Feststellung des eingetretenen Todes die Fragen nach der Todesart, der Todesursache und dem Todeszeitpunkt beantwortet. Auch für den Fachmann stellt die Ermittlung der Leichenliegezeit, insbesondere jenseits der 10-Stunden-Grenze, eine schwierige Aufgabe dar, da trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet die Todeszeitbestimmung auch heute noch nicht mit der gewünschten Sicherheit und Genauigkeit durchführbar ist.

1.1.1 Todeszeitbestimmung nach HENßGE

Zur Bestimmung der Leichenliegezeit sind besonders die Beurteilung der frühen Leichenveränderungen und die Prüfung der supravitalen Reaktionen geeignet. Aus der Beurteilung der späten Leichenveränderungen sind kaum Informationen zu gewinnen. HENßGE und MADEA kamen nach Prüfung der 1988 existierenden Daten zu dem Schluss, dass die Leichenliegezeit am exaktesten und vor allem am Leichenfundort praktikabel zu bestimmen sei, wenn die zu erhebenden Informationen aus Leichenabkühlung, Rigor, Livores, der supravitalen elektrischen Erregbarkeit der mimischen Muskulatur, der supravitalen mechanischen Erregbarkeit der Skelettmuskulatur sowie der supravitalen Erregbarkeit der Iris durch Pharmaka sich gegenseitig ergänzend ausgewertet werden (HENßGE und MADEA 1988a).

Um aus der Leichenabkühlung einen Rückschluss auf die Leichenliegezeit zu erhalten, kommt dabei das Rektaltemperatur-Todeszeit-Nomogramm von HENßGE zur Anwendung, das auf der Todeszeitrückrechnung nach dem Zwei-Exponenten-Modell von MARSHALL und HOARE basiert (MARSHALL and HOARE 1962, HENßGE und MADEA 1988b). Neben der tiefe Rektaltemperatur müssen sowohl die Umgebungstemperatur als auch das Körpergewicht ermittelt werden. Zusätzlich werden entsprechend den Auffindungsbedingun-

gen der Leiche verschiedene Körpergewichts-Korrekturfaktoren in die Todeszeitbestimmung einbezogen.

Die Beurteilung von Rigor und Livores erfolgt bei HENßGE nach wie vor rein subjektiv. Die Daten, aus denen der Zeitbezug des jeweils beschriebenen Zustandes von Rigor und Livores zur Leichenliegezeit abgeleitet wird, stammen aus einer Zusammenfassung der Literatur von 1811 bis 1960 durch MALLACH (MALLACH 1964). Auf Grund kleiner Stichprobenumfänge und z. T. stark differierender Zeitangaben in der zusammengefassten Literatur sollten die so ermittelten Zeitintervalle jedoch nur als relative Grenzwerte betrachtet werden (HENßGE und MADEA 1988c).

Die supravitale elektrische Erregbarkeit der mimischen Muskulatur wurde von KLEIN und KLEIN untersucht (KLEIN und KLEIN 1978). Dazu wurde die mimische Muskulatur durch Einstichelektroden unter Verwendung des Dresdner Reizgerätes gereizt. Entsprechend dem Ausmaß der erzielten Kontraktion ist ein Rückschluss auf die Leichenliegezeit möglich.

Bei der supravitalen mechanischen Erregbarkeit der Skelettmuskulatur müssen zwei Phänomene unterschieden werden, die beide für die Todeszeitbestimmung nach HENßGEs Vorschlag von Bedeutung sind. Beim Zsakósen Muskelphänomen handelt es sich um einen phasischen Muskeigenreflex (ZSAKÓ 1916, PROKOP 1975), den DOTZAUER in seinen Untersuchungen nie später als 2 h p.m. auslösen konnte (DOTZAUER 1958). Den ideomuskulären Wulst, als nur noch lokale Kontraktion der Muskulatur am Ort der mechanischen Reizung (PROKOP 1975), konnte DOTZAUER noch bis zu 12 h p.m. nachweisen (DOTZAUER 1958).

Die Prüfung der supravitalen Erregbarkeit von Sphincter bzw. Dilator pupillae durch Pharmaka wurde weiterführend von KLEIN und KLEIN untersucht (KLEIN und KLEIN 1978). Hierbei erwies sich die subkonjunktivale Injektion von Acetylcholin als am zuverlässigsten. Bei allen untersuchten Leichen konnte damit ausnahmslos bis 14 h p.m. eine Miosis ausgelöst werden.

1.1.2 Temperaturorientierte Todeszeitbestimmung

1.1.2.1 Das mathematische Modell

Bei dem von HENßGE vorgeschlagenen Methodenspektrum, das heute international Anwendung findet, besitzt die Todeszeitrückrechnung aus der Leichenabkühlung den höchsten Stellenwert unter allen Teilmethoden (HENßGE und MADEA 1988a). Hierbei wird die mathematische Modellierung zur Beschreibung des Abkühlverlaufes verwendet.

Das mathematische Modell wird erzeugt, indem durch Experimente gewonnene Temperatur-Zeit-Kurven durch einen analytischen Ausdruck möglichst genau beschrieben werden. Der ermittelte analytische Ausdruck trifft jedoch nur für solche Fälle mit exakt den gleichen Abkühlbedingungen wie in den ursprünglichen Abkühlexperimenten zu (MALL 2000). Diese speziellen Abkühlbedingungen wurden von HENßGE als Bezugsstandardbedingungen bezeichnet. Der durch HENßGE eingeführte Körpergewichts-Korrekturfaktor (HENßGE und MADEA 1988b) soll die Anwendbarkeit des gefundenen analytischen Ausdrucks auf eine begrenzte Anzahl an Abkühlsituationen ausweiten, die von den Bezugsstandardbedingungen abweichend sind.

In einer 2000 veröffentlichten Arbeit räumte HENßGE ein, dass das Hauptproblem der Nomogramm-Methode in der richtigen Wahl des Körpergewichts-Korrekturfaktors und der mittleren Umgebungstemperatur liegt (HENßGE et al. 2000). Er weist explizit darauf hin, dass seine Methode nicht bei Fällen mit Leichenverbringung oder mit abrupter Änderung der Umgebungstemperatur, insbesondere nicht bei Erhöhung der Umgebungstemperatur, anwendbar ist (ALTHAUS and HENßGE 1999, HENßGE et al. 2000).

1.1.2.2 Das physikalische Modell

Ein grundlegend neuer Ansatz, mit dem die oben angesprochenen Probleme bei der temperaturorientierten Todeszeitbestimmung zu lösen wären, konnte von MALL aufgezeigt werden (MALL 2000). Sie greift dabei die Idee der physikalischen Modellierung der Leichenabkühlung wieder auf. Es handelt sich hierbei um den Versuch, die einzelnen Wärmeabgabemechanismen Konvektion,

Konduktion und Strahlung durch die ihnen zugrundeliegenden physikalischen Gesetze zu berechnen (MALL 2000). Der Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass prinzipiell alle Arten von Abkühlsituationen erfasst werden können.

In früheren Arbeiten versuchten SELLIER, JOSEPH und SCHICKELE und HIRAIWA et al. die Komplexität der physikalischen Modellierung zu verringern, indem sie den menschlichen Körper als homogenen Zylinder unendlicher Länge abstrahierten (SELLIER 1958, JOSEPH and SCHICKELE 1970, HIRAIWA et al. 1980). Auf diese Weise vereinfachte sich zwar die zu lösende Wärmeleitungsgleichung, die von ihnen entwickelten Methoden konnten sich jedoch nie gegen die von HENßGE durchsetzen, zu gering war ihre Genauigkeit bei einer für den Rechtsmediziner erschwerten Handhabbarkeit.

MALL hatte das Ziel vor allem Nicht-Standard-Bedingungen „sowohl des abkühlenden Körpers (geometrische Bedingungen (Körperposition), Anfangsbedingungen (Hypo- oder Hyperthermie vor Todeseintritt)) als auch der Umgebung (Randbedingungen (erzwungene Konvektion, Einstrahlung, veränderte Umgebungstemperatur)) in ausreichender Weise berücksichtigen zu können“ (MALL 2000). Um die mathematischen Probleme bei der „Lösung der Wärmeleitungsgleichung unter komplexen Rand- und Anfangsbedingungen“ zu überwinden, wurde die Methode der Finiten Elemente eingesetzt. Mit speziellen Finite Elemente Computerprogrammen erfolgt die numerische Lösung partieller Differentialgleichungen, wie sie die Wärmeleitungsgleichung darstellt. Dadurch kann auf die bisher praktizierte Parameterreduktion weitgehend verzichtet werden. Die früher nicht auswertbaren Fälle mit Änderung der Umgebungstemperatur oder Einstrahlung auf den Leichnam können mit der Methode von MALL nun berechnet werden.

Die 1984 von HENßGE und BRINKMANN anhand eines konkreten Falles geübte Kritik an der thermodynamischen Modellierung ist auf MALLs Arbeit nicht anzuwenden (HENßGE und BRINKMANN 1984). Die Kritik bezog sich darauf, dass für das damals verwendete Modell nicht bewiesen wurde, dass es die Wirklichkeit hinreichend genau abbildete, und dass es sich bei den verwendeten Konstanten für den Wärmaustausch nur um angenommene, nicht jedoch

um bewiesene Zahlenwerte handelte. MALL hingegen entwickelt ihr Modell nachvollziehbar, passt es soweit wie möglich den anatomischen Gegebenheiten des menschlichen Körpers an. Die von ihr verwendeten Konstanten entstammen entweder anerkannten Quellen, eigenen Experimenten oder sind logisch hergeleitet. Auf weitere Ergebnisse von MALL zu diesem Thema muss gespannt gewartet werden.

Anhand dieses kurzen Exkurses ist ersichtlich, dass auf dem schon so stark beforschten Gebiet der Todeszeitbestimmung bis in die heutige Zeit immer wieder neue interessante Impulse auftreten.

1.1.3 Biochemische Methoden der Todeszeitbestimmung

Neben den oben aufgeführten Verfahren zur Todeszeitbestimmung wurde von vielen Autoren der Versuch unternommen, durch Untersuchung von Körperflüssigkeiten und verschiedenen Körpergeweben andere biochemische Methoden der Todeszeitbestimmung zu entwickeln. Hierbei wurden hämatologische Determinanten (z. B. Blutgerinnung, Zellvolumen, osmotische Resistenz, Hämoglobin-Gehalt des Serums, Viskosität, Gefrierpunkt, pH-Wert), N-haltige Verbindungen (z. B. Amino-Stickstoff, Histidin, Hypoxanthin, Xanthin, Rest-Stickstoff, Kreatinin, Ammoniak), der Kohlenhydratstoffwechsel (z. B. Milchsäure), anorganische Stoffe (z. B. Kalium, Chlorid, anorganisches Phosphat), Enzymaktivitäten (z. B. Transaminasen, Laktatdehydrogenase), Nukleotide (z. B. ATP, ADP, AMP) und vieles mehr untersucht (HENRY and SMITH 1980, MALLACH und LAUDAHN 1964, SCHLEYER 1959, SCHLEYER 1967). Als Untersuchungsmaterialien kamen unter anderem Blut, Liquor, Glas-körperflüssigkeit und unterschiedliche Organgewebe zum Einsatz.

Häufig konnte bei diesen Untersuchungen kein ausreichend enger Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Leichenliegezeit gefunden werden oder bei Existenz eines solchen Zusammenhanges streuten die Messwerte für die praktische Anwendung zu stark. Besonders mit steigendem PMI nimmt diese Streuung weiter zu. So fand SCHLEYER, dass

bei vielen untersuchten Substanzen die Variabilität der Messwerte jenseits der 20-Stunden-Grenze stark anstieg (SCHLEYER 1963).

Man unternahm den Versuch, diese Nachteile durch Kombination verschiedener untersuchter Parameter auszugleichen (SCHLEYER 1975). Die von SCHOURUP entwickelte Testbatterie bezog z. B. die axilläre Temperatur sowie die Milchsäure-, Rest-Stickstoff- und Amino-Stickstoffkonzentration im Liquor in die Berechnung der Leichenliegezeit ein (SCHOURUP 1950). Laut SCHOURUP sollte damit innerhalb der ersten 15 h p.m. die Todeszeit auf $\pm 1,5$ h genau zu bestimmen sein. Andere Autoren wie LUNDQUIST, der anhand eigener Untersuchungen mit SCHOURUPs Formel zu dem Schluss kam, dass das so ermittelte postmortale Intervall meist zu lang ist, oder wie SJÖVALL, der die Formel nur in den ersten Stunden postmortem für brauchbar hielt, konnten dieses enge Zeitfenster nicht bestätigen (SJÖVALL 1951, LUNDQUIST 1956).

In neuerer Zeit ist besonders die Glaskörperflüssigkeit in das Interesse der Forschung gerückt. Bei ihrer Untersuchung konnten zahlreiche Autoren einen engen Zusammenhang zwischen der Kalium- bzw. der Hypoxanthinkonzentration und der Leichenliegezeit nachweisen (KRAUSE et al. 1971, MADEA et al. 1994, JAMES et al. 1997, MUNOZ BARÚS et al. 2002). Trotz der relativ hohen Korrelation zum postmortalen Intervall fanden jedoch auch diese Parameter auf Grund der großen Messwertstreuung bis heute noch keine Anwendung in der Praxis.

1.2 Zielstellung

Bei toxikologisch-chemischen Untersuchungen von Leichenblut im Rechtsmedizinischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena fielen regelmäßig drei zunächst unbekannte Substanzen auf, die nachfolgend als Markersubstanzen bezeichnet werden. Diese Markersubstanzen traten bei der Untersuchung von eingesandtem Material Lebender nicht auf. Bei Leichen mit sehr langer Liegezeit konnten die Substanzen ebenfalls nicht gefunden werden. Bei den Markersubstanzen schien es sich somit um Stoffe zu handeln, die nur bei der

Untersuchung von Leichenmaterial auftraten, und deren Konzentration sich mit der Leichenliegezeit änderte.

Trotz der Feststellung von PROKOP, dass „chemische Untersuchungen, die den Grad der Dekomposition an bestimmten Abbauprodukten ... fassen wollen, von vornherein zum Scheitern verurteilt“ sind (PROKOP 1966), erschien es uns prüfenswert, ob aus den Konzentrationsänderungen der Markersubstanzen Informationen über die Leichenliegezeit gewonnen werden könnten, insbesondere jenseits der sogenannten kritischen 10-Stunden-Grenze. Die grundlegende Feststellung von FORSTER, dass die „Todeszeitbestimmung ... desto sicherer [wird]... je mehr Parameter herangezogen werden“ (FORSTER 1986a), hat uns ermuntert, diesem Phänomen nachzugehen, das gegebenenfalls einen weiteren Baustein zur Todeszeitschätzung in späteren postmortalen Zeitabschnitten liefern könnte.

1.2.1 Aufgabenstellungen

In den nachfolgenden Ausführungen wird mit Leichenliegezeit oder postmortalem Intervall (PMI) die Zeit bezeichnet, die vom Eintritt des Todes bis zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials verstrichen ist.

Unsere erste Aufgabe bestand in der Identifikation der Markersubstanzen.

Anschließend war ein geeignetes Verfahren zur Konzentrationsbestimmung der Markersubstanzen zu entwickeln, wobei eine Kombination von Flüssig-Flüssig-Extraktion und Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden sollte. Die Dünnschichtchromatographie mit UV-spektrometrischer Detektion wurde gewählt, weil im Vergleich zu anderen Verfahren wie z. B. der Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) oder der high performance liquid chromatography (HPLC) mit UV-spektrometrischer Detektion ein größerer Probendurchlauf pro Zeiteinheit möglich ist.

Weiterhin galt es herauszufinden, ob sich neben Blut auch die fäulnisresistentere Glaskörperflüssigkeit für den Nachweis und die Bestimmung der Markersubstanzen eignete.

Da die Untersuchung des Leichenmaterials nicht immer sofort nach der Entnahme möglich war, musste ferner dessen Stabilität bei entsprechender Lagerung geprüft werden.

Um einen Referenzwert für die Konzentrationen der Markersubstanzen in Leichenblut zu erhalten, wurde Blut von Probanden untersucht. Zusätzlich wollten wir bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen des Probandenmaterials (Vollblut und Serum) prüfen, in welchem Material und unter welchen Bedingungen die Markersubstanzen auftreten.

Nach Abschluss der vorangestellten notwendigen Versuchsreihen sollten die Leichenmaterialien mit bekanntem postmortalen Intervall mit der erarbeiteten Bestimmungsmethode auf ihren Gehalt an Markersubstanzen untersucht werden. Mit der statistischen Auswertung der Ergebnisse war zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Markersubstanzkonzentrationen und der Leichenliegezeit existiert.

2 Untersuchungsmaterial und Methodik

2.1 Biologisches Untersuchungsmaterial

2.1.1 Probandenblute

Von 17 gesunden Probanden, die weder Medikamente noch Nahrungsergänzungstoffe einnahmen, wurde Venenblut in Serum-Monovetten® ohne Trenngel entnommen. Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug 30,2 Jahre. Nach der Entnahme wurde das Blut sofort ohne vorherige Zentrifugation bei – 20°C eingefroren.

Bei fünf der Probanden wurde aus einer zusätzlich abgenommenen Serum-Monovette® durch Zentrifugation Serum gewonnen.

2.1.2 Leichenblute

Vorraussetzung für die Untersuchung des Blutes einer Leiche war ein genau bekannter Todeszeitpunkt. Deswegen bezogen wir nur solche Fälle ein, bei denen zum Todeszeitpunkt Zeugen anwesend waren bzw. bei denen der Patient zum Todeszeitpunkt durch Monitoring kontinuierlich überwacht wurde.

Insgesamt standen 69 Leichen mit bekannter Todeszeit zur Verfügung. Davon stammten 19 aus dem Rechtsmedizinischen und 20 aus dem Pathologischen Institut der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Leichenblute aus dem Institut für Pathologie hatte man Patienten entnommen, die auf den Intensivstationen des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena verstorben waren. Bei den Jenaer Leichen war der gesicherte Todeszeitpunkt aus den Sektionsprotokollen bekannt. Für die restlichen 30 Leichen, die dem Rechtsmedizinischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München entstammten und bei denen die Sterbestunde nur den Totenscheinen entnommen werden konnte, lag der Todeszeitpunkt weitestgehend gesichert vor.

Den Leichen wurde Herzblut entnommen. Dabei handelte es sich um Mischblut aus beiden Ventrikeln, das wir in Probengefäße ohne Zusatz abfüllten. Ohne Zentrifugation wurde es sofort bei – 20°C eingefroren .

2.1.3 Glaskörperflüssigkeit

Bei drei Leichen erfolgte zusätzlich die Gewinnung von Glaskörperflüssigkeit. Zur Entnahme verwendeten wir eine Injektionsspritze mit Metallkanüle. Nach Einstechen in den Bulbus wurde durch langsame Aspiration möglichst die gesamte Glaskörperflüssigkeit entnommen, in Probengefäße abgefüllt und bei – 20°C gelagert.

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.2.1.1 Geräte

- Abdampfvorrichtung TCS digitherm (Barkey GmbH & Co.KG)
- Auftrageautomat für DC und HPTLC TLS 100 (Baron Laborgeräte)
- Densitometer CD60 + Auswertungs-Software „SPECTRACALC“ (DESAGA)
- Minishaker MS 1 (IKA®)
- Photometer SPECORD M40 (CARL ZEISS JENA)
- UV-Lampe: $\lambda = 254 \text{ nm}$ (Helios)
- Zentrifuge ROTOFIX 32 (Hettich)

2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Probengefäße (Autosampler vials: Volumen = 1,2 ml; Typ 1.1-STVG) mit Schraubverschluss (Typ 8-SCJ) und geschlitzten PTFE-Septen (CHROMACOL)
- DC-Entwicklungskammer (Normalkammer) 22,5 × 22,0 × 10,5 cm (DESAGA)
- Dünnschichtchromatographie-Platten 10 × 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄ (mit Fluoreszenzindikator) (MERCK)
- Rechteck-Küvetten (Luminescence Spectroscopy Cells): d = 1,0 cm (PERKIN ELMER Corp.)

2.2.2 Chemikalien

2.2.2.1 Reinsubstanzen

- | | | |
|------------------------------|---------------------|--------------------------|
| - Ammoniak-Lösung 25% | EG-Nr. 007-001-01-2 | (VEB LABORCHEMIE APOLDA) |
| - Chloroform SupraSolv® | EG-Nr. 200-663-8 | (MERCK) |
| - Dichlormethan LiChrosolv® | EG-Nr. 200-838-9 | (MERCK) |
| - Ethylacetat LiChrosolv® | EG-Nr. 205-500-4 | (MERCK) |
| - Kaliumdihydrogenphosphat | EG-Nr. 001.04873 | (MERCK) |
| - Methanol SupraSolv® | EG-Nr. 200-659-6 | (MERCK) |
| - Methanol Uvasol® | EG-Nr. 200-659-6 | (MERCK) |
| - di-Natriumhydrogenphosphat | EG-Nr. 001.06586 | (MERCK) |
| - Nicotinamid | EG-Nr. 202-713-4 | (SIGMA®) |
| - Thymidin | EG-Nr. 200-070-4 | (SIGMA®) |
| - Thymin | EG-Nr. 200-616-1 | (SIGMA®) |
| - Uracil | EG-Nr. 200-621-9 | (SIGMA®) |

2.2.2.2 Verwendete Lösungen

- Stammlösungen:
 - Nicotinamid: 1 mg Nicotinamid / ml Methanol
 - Thymidin: 1 mg Thymidin / ml Methanol
 - Thymin: 1 mg Thymin / ml Methanol
 - Uracil: 1 mg Uracil / ml Methanol
- Eichlösung = (200 ng Nicotinamid + 100 ng Thymin + 700 ng Uracil) / µl Methanol
(Die Eichlösung wurde durch Kombination der Stammlösungen von Nicotinamid, Thymin und Uracil erzeugt.)
- Fließmittellösungen:
 - EMA = 63 ml Ethylacetat : 7 ml Methanol : 4 ml Ammoniak (25%)
 - CM = 90 ml Chloroform : 10 ml Methanol
- Pufferlösungen:
 - Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer 30 g / 200 ml pH-Wert = 4,8
 - di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer 20 g / 200 ml pH-Wert = 9,0
 - Phosphatpuffer nach Sørensen pH-Wert = 7,5

2.3 Methodik

2.3.1 Identifikation der Markersubstanzen

Zur Identifikation der Markersubstanzen wurden ihre Remissionsspektren und dünnschichtchromatographischen R_F -Werte mit denen bekannter Substanzen verglichen.

2.3.2 Isolation und Quantifizierung der Markersubstanzen

Um die Markersubstanzen aus dem Untersuchungsmaterial zu isolieren, wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion angewendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei der anschließend durchgeführten Dünnschichtchromatographie densitometrisch.

2.3.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion beruht die Stofftrennung auf den unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der zu trennenden Stoffe in einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem (ZEECK et al. 2000). In dieser Arbeit stellte das Untersuchungsmaterial die hydrophile Phase dar. Als lipophile Phase dienten verschiedene organische Lösungsmittel. Um aus der hydrophilen Phase eine möglichst große Menge an Markersubstanzen extrahieren zu können, setzten wir die lipophile Phase im Überschuss zu.

2.3.2.2 Dünnschichtchromatographie und Densitometrie

Wie oben erwähnt, schloss sich an die Flüssig-Flüssig-Extraktion die Dünnschichtchromatographie an. Bei der Dünnschichtchromatographie handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem das Elutionsmittel als mobile Phase unter der Wirkung von Kapillarkräften die stationäre Phase durchströmt (DOERFFEL et al. 1994a, WOLTER 2000). Hierdurch wird ein, in der mobilen Phase mitgeführtes, Substanzgemisch durch Wechselwirkung mit der stationären Phase in seine Komponenten zerlegt. Als Sorbens kommt meist Kieselgel (= Siliziumdi-

oxid) zur Anwendung, welches bei den verwendeten Fertigplatten schon als dünne Schicht auf den Glasplatten aufgebracht vorliegt.

Identifizierung und Quantifizierung erfolgen bei der Dünnschichtchromatographie auf dieser Schicht. Hierzu kommen Densitometer zur Anwendung, bei denen es sich um Scanner zur Direktmessung des von einer DC-Platte remittierten Lichtes handelt.

Um notwendige Eingabeparameter, wie z. B. die Laufhöhen der farblosen Markersubstanzen, für die computergestützte densitometrische Auswertung leicht bestimmen zu können, wird häufig bei der DC-Platten-Herstellung ein Fluoreszenzindikator („F₂₅₄“) in die Kieselgelschicht mit eingebracht. Betrachtet man eine derart präparierte DC-Platte unter einer UV-Lampe (Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$), werden die Substanzflecken auf Grund der durch sie verursachten Fluoreszenzminderung sichtbar (visuelle Detektion der Chromatogramme) und die Laufhöhen gut ablesbar.

Das Prinzip der Densitometrie besteht darin, dass nach initialer Beleuchtung der DC-Platte mit Licht bestimmter Wellenlänge das remittierte Licht gemessen wird. Als Remission bezeichnet man die Lichtreflexion an nichtspiegelnden Oberflächen, wie sie z. B. die Kristalloide der Kieselgelschicht bilden (WOLTER 2000). Hierbei hängt die Remission sowohl von der Lichtabsorption durch die zu bestimmende Substanz, als auch von der Streuung durch das Sorbens ab. Auf Grund des bestehenden Zusammenhanges zwischen der Remission und der zu bestimmenden Substanzmenge, kann unter Verwendung einer Kalibrierungskurve die auf der Platte vorliegende Substanzmenge ermittelt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung misst man bei konstanter Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ die Remission für die gesamte Chromatographiebahn (Remissionsortskurve). Die Remissionmessung an einem festgelegten Punkt der Chromatographiebahn bei UV-Licht im Wellenlängenbereich von $\lambda_0 = 200 \text{ nm}$ bis $\lambda_E = 330 \text{ nm}$ dient durch Abbildung der UV-Spektren der Substanzidentifikation.

Zur Durchführung der Dünnschichtchromatographie dampften wir die lipophile Phase, die man bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion erhalten hatte, ein. Der eingedampfte Rückstand wurde mit Methanol rückgelöst und maschinell auf eine DC-Platte aufgetragen. Nach Entwicklung der DC-Platte in einer Normalkammer schloss sich die oben erläuterte densitometrische Quantifizierung an.

2.3.3 Statistik

Um die statistische Auswertung skizzieren zu können, muss an dieser Stelle vorweggenommen werden, dass es sich bei den Markersubstanzen um Nicotinamid, Thymin und Uracil handelt.

Statistische Berechnungen wurden mit der Software Microsoft Excel 2000 und SPSS 10.13 durchgeführt.

Das postmortale Intervall, die Nicotinamid-, Thymin- und Uracilkonzentration sowie die Extraktionsausbeuten stellen verhältnisskalierte Werte dar.

Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Ein-Stichproben-Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, der als nichtparametrischer Test uneingeschränkt angewendet werden kann. Die Nicotinamid- und die Uracilkonzentration, das postmortale Intervall sowie die Extraktionsausbeuten stellten sich als hinreichend normalverteilt heraus. Die Thyminkonzentration wich in ihrer Verteilung signifikant von der Normalverteilung ab. Bei alleiniger Auswertung der oben aufgeführten normalverteilten Variablen wurden parametrische Verfahren, bei gemeinsamer Auswertung mit den nicht normalverteilten Variablen nichtparametrische Verfahren angewendet.

Bei der Testung von Glaskörperflüssigkeit auf ihre Eignung als Untersuchungsmaterial wurde der t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt, um zu untersuchen, ob ein signifikanter Konzentrationsunterschied an Nicotinamid und Uracil zwischen Blut und Glaskörperflüssigkeit besteht.

Zur Prüfung, ob sich durch den Tieffriervorgang die Nicotinamidkonzentration verändert, wurde der Welch-Test durchgeführt, da auf Grund der Varianzheterogenität der zu vergleichenden Stichproben der t-Test nicht angewendet werden konnte.

Um die Stabilität von Nicotinamid, Thymin und Uracil bei -20°C zu testen, wurde der Friedman-Test angewendet, bei dem es sich um den übliche Median-Test zum nichtparametrischen Vergleich mehrerer gebundener Stichproben handelt. Zur Minimierung des Fehlers 2. Art, legten wir das Signifikanzniveau mit $\alpha = 0,10$ fest.

Zur Klärung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen den Markersubstanzkonzentrationen in Leichenblut und dem postmortalen Intervall existiert, wurde in einfach-linearer Darstellung das PMI in Abhängigkeit von den Nicotinamid-, Thymin- und Uracilkonzentrationen dargestellt. Mittels einfacher und multipler linearer Regressionanalyse erfolgte die Prüfung auf einen linearen Zusammenhang. Dabei setzten wir das PMI als die abhängige und die Markersubstanzkonzentrationen als die unabhängigen Variablen ein.

3 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Markersubstanzen

Um die Markersubstanzen zu identifizieren, wurden ihre Remissionsspektren und dünnsschichtchromatographischen R_F -Werte mit denen bekannter Substanzen verglichen. Als Vergleichsstoffe wählten wir Nicotinamid, Thymidin, Thymin und Uracil. Thymidin wurde ausgewählt, weil dessen Spektrum dem der einen unbekannten Markersubstanz ähnelte, die anderen drei genannten Stoffe wurden gewählt, weil uns aus der Literatur bekannt war, dass sie bei der spektrophotometrischen Analyse auf Alkaloide an Leichenmaterial auftraten (KAEMPE 1967) und zusätzlich ihre Spektren ebenfalls denen der Markersubstanzen ähnelten.

Ein Leichenvollblut, von dem aus Voruntersuchungen das Vorhandensein der Markersubstanzen bekannt war, und ein Probandenserum kamen als Untersuchungsmaterialien zur Anwendung. Es wurden je $2 \times 0,25$ ml aliquotiert. Zu den Probandenserum-Aliquots setzten wir die Reinstoffe Nicotinamid, Thymidin, Thymin und Uracil als Vergleichssubstanzen zu. Danach erfolgte für alle Aliquots die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat als Lösungsmittel. Anschließend wurden auf zwei DC-Platten jeweils das aufgearbeitete Leichenvollblut, das aufgearbeitete bestückte Probandenserum und die Eichlösung, zur Generierung der Eichkurve, aufgetragen. Als Laufmittel für eine der Platten kam EMA, als Laufmittel für die andere CM zum Einsatz.

Die Markersubstanzen wiesen dieselben Remissionsspektren und Laufhöhen in den zwei verschiedenen Laufmitteln (EMA und CM) wie Nicotinamid, Thymin und Uracil der Eichlösung bzw. des bestückten Probandenserums auf (Tabelle 1, Tabelle 2). Thymidin hingegen glich keiner der drei Markersubstanzen (R_F -Wert in EMA (Thymidin) = 0,133; Maximum des UV-Spektrums = 269 nm).

Tabelle 1: Vergleich der unbekannten Markersubstanzen A, B und C mit Nicotinamid, Thymin und Uracil; Laufmittel: EMA

| | Laufstrecke in mm | R _F -Wert | Wellenlänge der UV- Spektrenmaxima in nm |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|---|
| Uracil der Eichlösung | 6,7 | 0,103 | 259 |
| Uracil in Serum ¹ | 6,8 | 0,105 | 260 |
| Markersubstanz A | 6,4 | 0,098 | 259 |
| Thymin der Eichlösung | 11,6 | 0,178 | 265 |
| Thymin in Serum ¹ | 11,5 | 0,177 | 266 |
| Markersubstanz B | 11,1 | 0,170 | 266 |
| Nicotinamid der Eichlösung | 18,9 | 0,291 | 216; 260 |
| Nicotinamid in Serum ¹ | 18,5 | 0,285 | 215; 260 |
| Markersubstanz C | 18,0 | 0,276 | 216; 260 |

Serum¹ Probandenserum wurde als Matrix verwendet

Die zu identifizierenden Markersubstanzen wurden willkürlich mit den Buchstaben A, B und C bezeichnet.

Tabelle 2: Vergleich der unbekannten Markersubstanzen A, B und C mit Nicotinamid, Thymin und Uracil; Laufmittel: CM

| | Laufstrecke in mm | R _F -Wert | Wellenlänge der UV- Spektrenmaxima in nm |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|---|
| Uracil der Eichlösung | 7,8 | 0,116 | 258 |
| Uracil in Serum ¹ | 7,8 | 0,116 | 259 |
| Markersubstanz A | 7,8 | 0,116 | 258 |
| Nicotinamid der Eichlösung | 10,5 | 0,157 | 212; 259 |
| Nicotinamid in Serum ¹ | 10,3 | 0,154 | 212; 260 |
| Markersubstanz C | 10,7 | 0,160 | 210; 260 |
| Thymin der Eichlösung | 10,9 | 0,163 | 266 |
| Thymin in Serum ¹ | 10,8 | 0,161 | 268 |
| Markersubstanz B | 11,5 | 0,172 | 265 |

Serum¹ Probandenserum wurde als Matrix verwendet

Die zu identifizierenden Markersubstanzen wurden analog Tabelle 1 willkürlich mit den Buchstaben A, B und C bezeichnet.

Da die Markersubstanzen im direkten Vergleich mit Nicotinamid, Thymin und Uracil sowohl in den Remissionsspektren als auch in den Wanderungsgeschwindigkeiten in zwei verschiedenen Laufmitteln übereinstimmten, ist anzunehmen, dass es sich bei ihnen um Nicotinamid, Thymin und Uracil handelt (Abbildung 1).

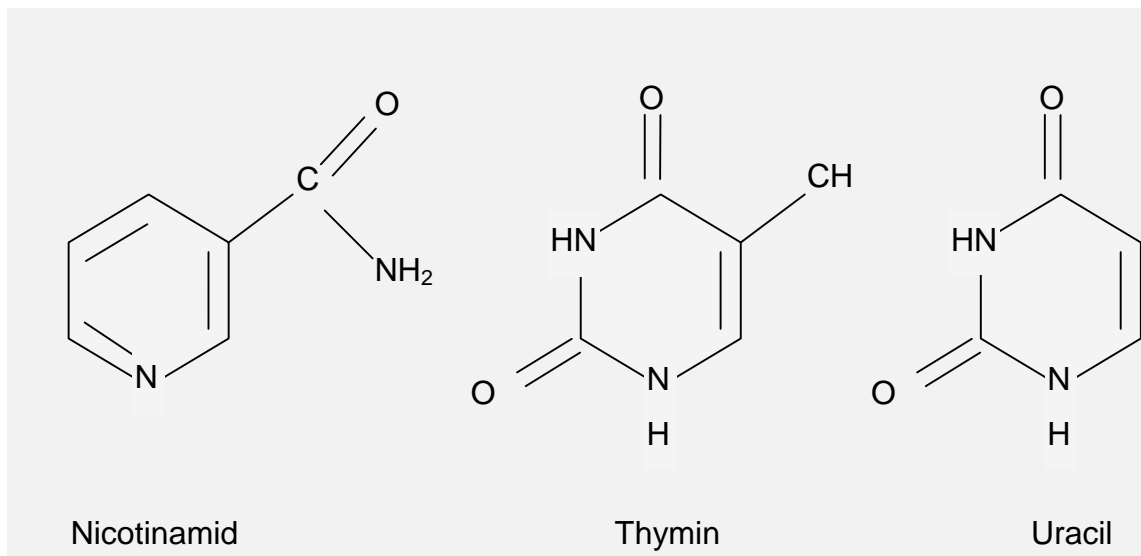


Abbildung 1: Strukturformeln von Nicotinamid, Thymin und Uracil (LÖFFLER und PETRIDES 1998 a und d)

3.2 Entwicklung der Analysenmethode

Die Isolierung und Quantifizierung der Markersubstanzen sollte durch Kombination von Flüssig-Flüssig-Extraktion und Dünnschichtchromatographie mit UV-spektrometrischer Detektion erfolgen. Es galt zu prüfen, ob sich das besagte Kombinationsverfahren für diesen Zweck eignete.

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Gestaltung der Untersuchungsmethode. Wesentliche Faktoren sind die Wahl des Extraktionsmittels, die Einstellung eines bestimmten pH-Wertes und das Phasenverhältnis bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Es folgen die genaue Beschreibung der erarbeiteten Bestimmungsmethode und einige Bemerkungen zu ihrer Präzision sowie den Nachweisgrenzen der Markersubstanzen.

3.2.1 Extrahierbarkeit

Um hohe Extraktionsraten bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion zu erhalten, testeten wir die relativ polaren Lösungsmittel Ethylacetat und Dichlormethan bei pH-Wert 9,0 auf ihre Eignung für die Extraktion unserer Substanzen.

Hierzu lösten wir Nicotinamid, Thymin und Uracil in di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH-Wert 9,0) auf eine Endkonzentration von 10 µg/ml. Es wurden für jede Substanz 4 × 3 ml aliquotiert und je zwei Aliquots mit 3 ml Dichlormethan verdünnt. Alle Proben wurden für 1 min gemischt und zentrifugiert (2 min, 3000 * g). Nach Abpipettieren von jeweils 2,5 ml des Überstandes aller Proben (= Pufferphase) für die Auswertung erfolgte mittels Photometer die Messung der Extinktionskurven im Wellenlängenbereich von $\lambda_0 = 217$ nm bis $\lambda_E = 320$ nm gegen den Puffer als Leerwert. Da nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration einer Substanz in stark verdünnter Lösung der Extinktion proportional ist (WACHTER und HAUSEN 1985), konnte aus den Extinktionsmaxima der Aliquots ohne (= vor Extraktion) und nach Ausschütteln (= nach Extraktion) mit Dichlormethan die Extraktionsrate für Dichlormethan entsprechend der Formel in Abbildung 2 werden.

$$\text{Extraktionsrate} = \frac{\text{Extinktion (vor Extraktion)} - \text{Extinktion (nach Extraktion)}}{\text{Extinktion (vor Extraktion)}}$$

Abbildung 2: Formel zur Berechnung der Extraktionsrate (= Ausbeute in der organischen Phase (= Dichlormethan))

Anschließend wurden Nicotinamid, Thymin und Uracil jeweils in Ethylacetat zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml gelöst und in je 4 Aliquots zu 3 ml portioniert. Je zwei Aliquots wurden mit 3 ml di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer versetzt, 1 min ausgeschüttelt und zentrifugiert (2 min, 3000 * g). Darauf wurden 2,5 ml des Überstandes aller Proben (= Ethylacetatphase) abpipettiert und eingedampft sowie der resultierende Substanzrückstand in 2,5 ml Methanol rückgelöst. Die Messung der Extinktionen erfolgte photometrisch gegen Methanol als Leerwert. Die Berechnung der Extraktionsrate erfolgte entsprechend der Formel in Abbildung 3.

$$\text{Extraktionsrate} = \frac{\text{Extinktion (nach Extraktion)}}{\text{Extinktion (vor Extraktion)}}$$

Abbildung 3: Formel zur Berechnung der Extraktionsrate (= Ausbeute in der organischen Phase (= Ethylacetat))

Dieses aufwendigere Verfahren musste gewählt werden, da auf Grund der Eigenabsorption von Ethylacetat eine direkte Messung der nach der Extraktion mit Ethylacetat gewonnenen wässrigen Phase nicht möglich ist.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei Verwendung von Ethylacetat als Extraktionsmittel die Extraktionsraten von Nicotinamid, Thymin und Uracil deutlich höher waren als bei Verwendung von Dichlormethan (Tabelle 3).

Tabelle 3: Extraktionsraten in % bei Flüssig-Flüssig-Extraktion mit verschiedenen Extraktionsmitteln

| | Dichlormethan | Ethylacetat |
|-------------|---------------|-------------|
| Nicotinamid | 10,0 | 26,1 |
| Thymin | 1,8 | 12,2 |
| Uracil | 0,2 | 8,8 |

Auf Grund dieser Ergebnisse arbeiteten wir nachfolgend mit Ethylacetat als Extraktionsmittel bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

Des Weiteren untersuchten wir, ob die Extraktionsraten von Nicotinamid, Thymin und Uracil bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion, auf Grund der elektrolytischen Dissoziation, vom pH-Wert der hydrophilen Untersuchungsmaterialphase beeinflusst werden.

Die Durchführung des Versuches erfolgte, wie im vorangehenden Abschnitt für Ethylacetat als Extraktionsmittel beschrieben, wobei anstelle von di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH-Wert 4,8) und Phosphatpuffer nach Sørensen (pH-Wert 7,5) zum Einsatz kamen.

Den Ergebnissen kann entnommen werden, dass der pH-Wert der hydrophilen Untersuchungsmaterialphase die Extraktionsraten nicht wesentlich beeinflusst (Tabelle 4).

Tabelle 4: Extraktionsraten in % bei unterschiedlichen pH-Werten der Untersuchungsmaterialphase

| | pH 4,8 | pH 7,5 | pH 9,0 |
|-------------|--------|--------|--------|
| Nicotinamid | 22,4 | 21,6 | 26,1 |
| Thymin | 14,7 | 13,3 | 12,2 |
| Uracil | 8,4 | 7,1 | 8,8 |

Auf Grund dessen konnte bei den weiteren Untersuchungen auf die Einstellung eines speziellen pH-Wertes der Untersuchungsmaterialphase verzichtet werden.

Zuletzt prüften wir, wie stark sich das Volumenverhältnis von hydrophiler Untersuchungsmaterialphase zu lipophiler Extraktionsmittelfase auf die Gesamtausbeute auswirkte. (Die Gesamtausbeute steht für die Ausbeute, die man bei Anwendung unserer Substanzbestimmungsmethode erzielt. Im Gegensatz hierzu bezieht sich die weiter oben besprochene Ausbeute bzw. Extraktionsrate alleinig auf die Flüssig-Flüssig-Extraktion.)

Wir stellten drei Leichenblut-Aliquots zu 0,25 ml her. Ein Aliquot blieb unverdünnt, die anderen zwei wurden 1 : 2 und 1 : 4 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dann erfolgte die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit jeweils 5 ml Ethyl-

acetat. Nach Eindampfen, Rücklösen, Auftragung auf die DC-Platte und Entwicklung in EMA erfolgte die Auswertung densitometrisch.

Wir berechneten die Gesamtausbeuten für unser Bestimmungsverfahren. Wie zu erkennen ist, verringerten sich diese für alle drei Markersubstanzen bei Verringerung des Phasenverhältnisses lipophil zu hydrophil (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich der Gesamtausbeuten in % bei unterschiedlicher wässriger Verdünnung des untersuchten Leichenblutes

| Verdünnung | Zugesetztes Wasser-Volumen in ml | Phasenverhältnis (lipophil/hydrophil) | Nicotinamid in % | Thymin in % | Uracil in % |
|------------|-------------------------------------|--|---------------------|----------------|----------------|
| Unverdünnt | 0,00 | 20 | 65 | 68 | 63 |
| 1 : 2 | 0,25 | 10 | 51 | 54 | 49 |
| 1 : 4 | 0,75 | 5 | 30 | 31 | 35 |

Die Ergebnisse zeigen, dass das Verhältnis von hydrophiler Phase (= Untersuchungsmaterial) zu lipophiler Phase (= Extraktionsmittel) einen deutlichen Einfluss auf die Gesamtausbeuten hat, und spiegeln das Nernstsche Verteilungsgesetz (Abbildung 17) wider.

Nachfolgend wird deswegen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit hohem Überschuss an Extraktionsmittel gearbeitet, indem zu 0,25 ml des Untersuchungsmaterials 5 ml des Extraktionsmittels Ethylacetat zugesetzt werden.

3.2.2 Methodenbeschreibung

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangestellten Abschnitte versuchten wir, eine optimale Bestimmungsmethode für Nicotinamid, Thymin und Uracil zu entwickeln. Nachfolgend wird diese Bestimmungsmethode wiedergegeben. Mit ihr wurde anschließend das biologische Untersuchungsmaterial bearbeitet. Dabei erfolgten immer Doppelbestimmungen, aus deren Ergebnissen wir jeweils den Mittelwert berechneten.

Für die Stoffbestimmung setzten wir 0.25 ml Untersuchungsmaterial ein, da bei Verwendung kleinerer Untersuchungsmaterial-Volumina Pipettierfehler sehr großen Einfluss erlangt hätten. Nach Zusatz von 5 ml Ethylacetat, Schütteln (Minishaker, 40 Sekunden, 2200 Anschläge/min) und Zentrifugation (2 min, 3000 * g) dampften wir 1 ml des Überstandes bei 42°C ein. Mit diesem Verfahren wurden die in 3.2.2.1 angegebenen Nachweisgrenzen erreicht. Der eingedampfte Rückstand wurde mit 12 µl Methanol erneut in Lösung gebracht. Nach ausreichendem Schütteln und Zentrifugation erfolgte die Auftragung von jeweils 10 µl automatisch mittels des Auftragegerätes TLS 100 auf eine DC-Platte.

Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch anhand von Kalibrationskurven (Abbildung 4), die wir durch Auftragung von fünf in arithmetischer Reihe ansteigenden Volumina ($V_n = n * 1 \mu\text{l}$, $n = [1,5]$) der in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Eichlösung auf die DC-Platte erzeugten.

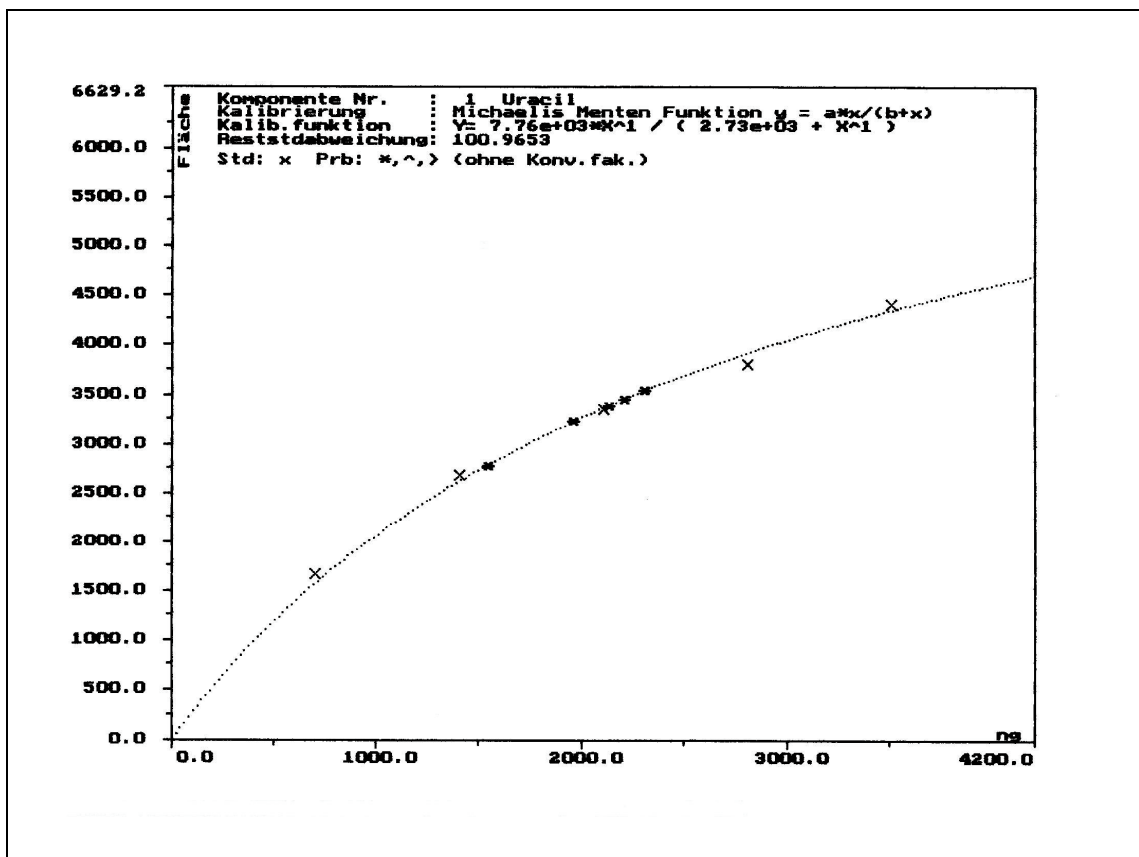


Abbildung 4: Kalibrationskurve am Beispiel von Uracil

Der Kalibrationsbereich für Nicotinamid reichte somit von 200 – 1000 ng, der für Thymin von 100 – 500 ng und der für Uracil von 700 – 3500 ng. Da die Remissions-Signalintensitäten bei der Densitometrie mit steigenden Stoffkonzentrationen einer Sättigung unterliegen und die Kalibrationskurve deswegen einer Michaelis-Menten-Funktion entspricht, konnten nur Substanzkonzentrationen bestimmt werden, die innerhalb des Eichkurvenbereichs lagen bzw. diesen nicht zu weit verließen.

Anschließend entwickelten wir die DC-Platte in einer Normalkammer mit frisch hergestelltem EMA. Nach einer Laufzeit von 18 min erfolgte der Abbruch des Trennvorganges.

Durch Bestrahlung der DC-Platte mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm wurden die Markersubstanzflecken sichtbar und die notwendigen Informationen zur Durchführung der computergestützten Densitometrie, wie z. B. die Laufhöhen der Markersubstanzen, konnten bestimmt werden.

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit folgenden Messmethoden:

- (1) Remissionsmessung einer gesamten Chromatographiebahn bei Wellenlänge $\lambda = 260$ nm (Remissionsortskurve)
- (2) Remissionsmessung einer gesamten Chromatographiebahn bei drei verschiedenen Wellenlängen ($\lambda_1 = 210$ nm, $\lambda_2 = 260$ nm und $\lambda_3 = 310$ nm) (Remissionsortskurven) (Abbildung 5)
- (3) Remissionsspektren-Bestimmung bei Wellenlängen von $\lambda_{\text{Start}} = 200$ nm bis $\lambda_{\text{Ende}} = 330$ nm an einem bestimmten Punkt der DC-Platte (Abbildung 6)

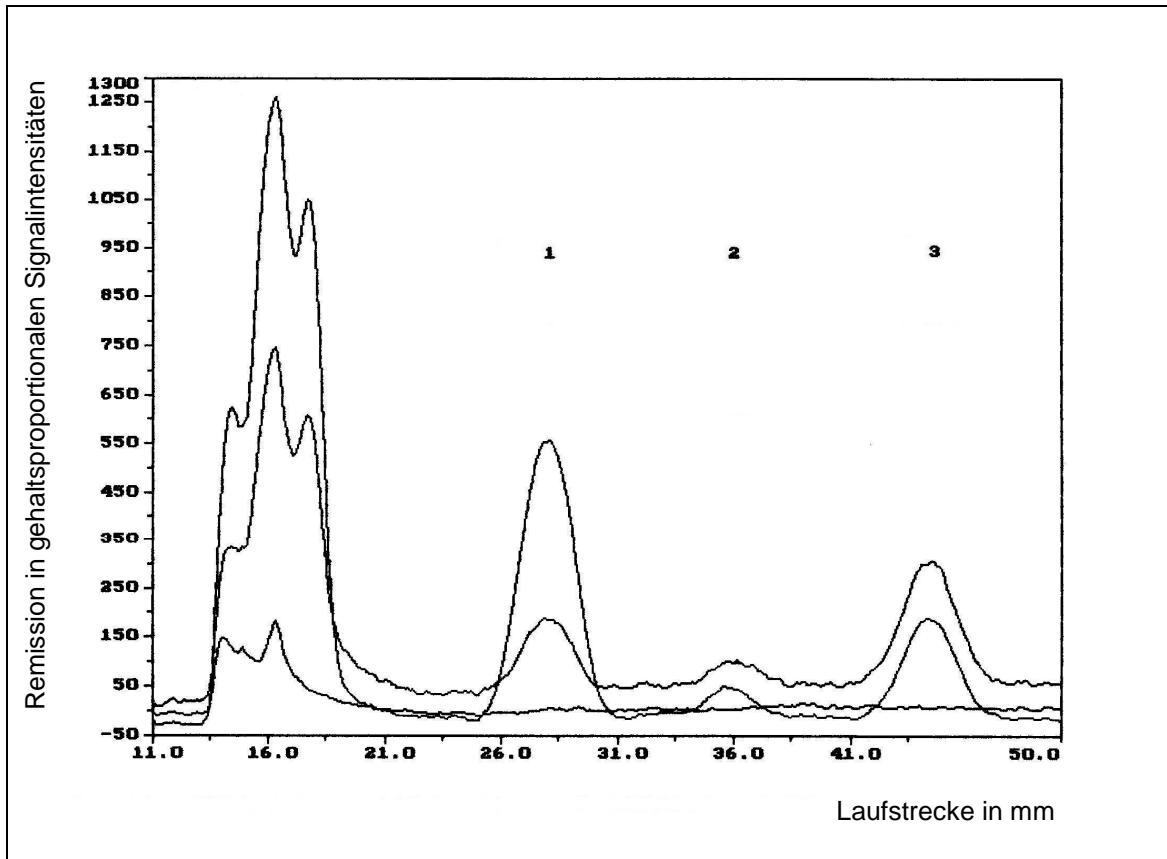


Abbildung 5: Remissionsmessung einer gesamten Chromatographiebahn bei drei verschiedenen Wellenlängen ($\lambda_1 = 210 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 260 \text{ nm}$ und $\lambda_3 = 310 \text{ nm}$)
Peak 1 = Uracil, Peak 2 = Thymin, Peak 3 = Nicotinamid

Messmethode 1, die bei konstanter Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ für die gesamte Chromatographiebahn die Remission ermittelt (Remissionsortskurve), dient zur Konzentrationsbestimmung der untersuchten Substanzen.

Mit der Messmethode 2 wird ebenfalls die Remission der gesamten Chromatographiebahn gemessen, jedoch bei drei verschiedenen Wellenlängen ($\lambda_1 = 210 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 260 \text{ nm}$ und $\lambda_3 = 310 \text{ nm}$). Wenn die Peakmaxima der Remissionsortskurven dieser drei verschiedenen Wellenlängen exakt übereinander liegen, wie in Abbildung 5 zu sehen, kann man schlussfolgern, dass der entsprechende Peak einer Reinsubstanz entspricht.

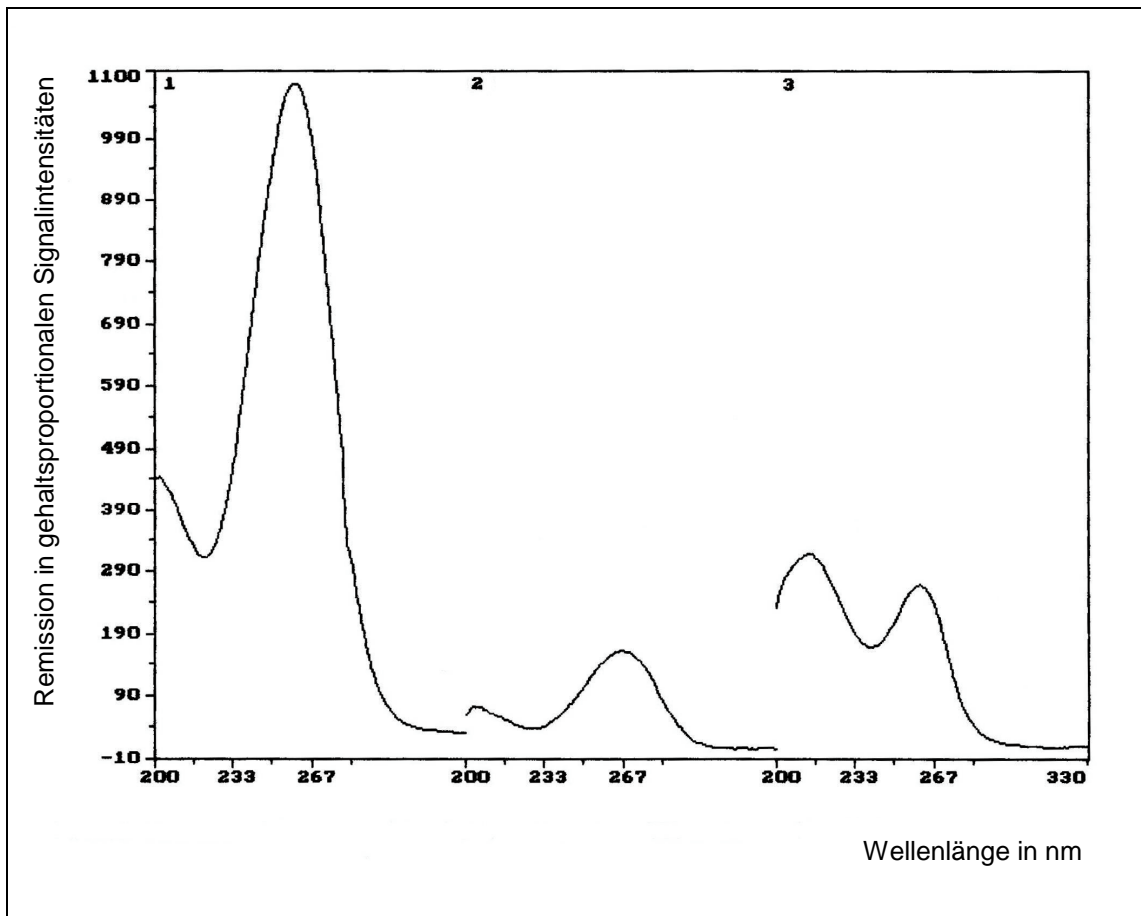


Abbildung 6: UV-Spektren von Uracil (1), Thymin (2) und Nicotinamid (3)

Die Messmethode 3, die an einem festgelegten Punkt der Chromatographiebahn die Remission bei UV-Licht im Wellenlängenbereich von $\lambda_{\text{Start}} = 200 \text{ nm}$ bis $\lambda_{\text{Ende}} = 330 \text{ nm}$ ermittelt, dient der Stoffidentifikation.

3.2.2.1 Präzision der Methode und Nachweisgrenzen der Substanzen

Um die oben beschriebene Bestimmungsmethode auf ihre Reliabilität zu untersuchen, ermittelten wir die In-der-Serie Präzision und die Tag-zu-Tag Präzision. (Die Präzision wird durch den Variationskoeffizienten der Messreihe ausgedrückt und macht eine Aussage über die Streuung der Messwerte aus ein und derselben Probe, Stabilität des Materials vorausgesetzt.)

Zur Bestimmung der In-der-Serie Präzision dienten zwei Probandenblute von denen wir jeweils 10 Aliquots zu 0,25 ml herstellten. Zu den Aliquots des einen Blutes wurden je 2,5 µg Nicotinamid, 1,25 µg Thymin und 8,75 µg Uracil (= je 12,5 µl der für die Eichkurve verwendeten Eichlösung; Serie 1), zu den Aliquots des anderen Blutes je 5 µg Nicotinamid, 2,5 µg Thymin und 17,5 µg Uracil (= je 25 µl der für die Eichkurve verwendeten Eichlösung; Serie 2) zugesetzt. Danach erfolgte die Weiterverarbeitung wie unter 3.2.2 beschrieben.

Die Präzision in den beiden Serien betrug 5,7 bis 18,5%. Bei Messung höherer Substanzkonzentrationen (Serie 2) nahm der Variationskoeffizient deutlich niedrigere Werte an als bei der Messung niedrigerer Substanzkonzentrationen (Serie 1), was einer höheren Präzision entspricht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Präzision in der Serie (Variationskoeffizienten in %), N = 10

| | Substanz | Konzentration in µg/ml | Variationskoeffizient in % |
|---------|-------------|------------------------|----------------------------|
| Serie 1 | Nicotinamid | 9,5 | 18,5 |
| | Thymin | 4,8 | 11,4 |
| | Uracil | 33,3 | 11,3 |
| Serie 2 | Nicotinamid | 18,2 | 7,3 |
| | Thymin | 9,1 | 5,7 |
| | Uracil | 63,6 | 9,2 |

Zur Bestimmung der Tag-zu-Tag Präzision brachten wir auf jede Dünnschichtchromatographie-Platte eine Kontrollprobe mit auf. Die Kontrollprobe enthielt eine definierte Menge in destilliertem Wasser gelöster Markersubstanzen ([Nicotinamid] = 18,2 µg/ml; [Thymin] = 9,1 µg/ml; [Uracil] = 63,6 µg/ml) und wurde wie eine normale Probe entsprechend 3.2.2 weiterverarbeitet.

Die Tag-zu-Tag Präzision betrug zwischen 10,4 und 13,3% (Tabelle 7).

Tabelle 7: Präzision von Tag zu Tag (Variationskoeffizienten in %), N = 52

| Substanz | Variationskoeffizient in % |
|-------------|----------------------------|
| Nicotinamid | 13,3 |
| Thymin | 10,4 |
| Uracil | 13,3 |

Die Nachweisgrenzen schätzten wir anhand der Formel in Abbildung 7 ab (DOERFFEL et al. 1994b). Für Nicotinamid ergab sich eine Nachweisgrenze von 0,5 µg/ml Untersuchungsmaterial, für Thymin von 0,4 µg/ml Untersuchungsmaterial und für Uracil von 0,6 µg/ml Untersuchungsmaterial (Anhang: 7.4 Bestimmung der Nachweisgrenzen).

$$\text{Nachweisgrenze} = 3 * \frac{\text{Standardabweichung (der Blindwerte)}}{\text{Anstieg der Kalibrationskurve}}$$

Abbildung 7: Formel zur Berechnung der Nachweisgrenze (DOERFFEL et al. 1994b)

3.3 Untersuchung des biologischen Materials

3.3.1 Glaskörperflüssigkeit als Untersuchungsmaterial

Um herauszufinden, ob sich neben Blut auch die fäulnisresistentere Glaskörperflüssigkeit für unsere Untersuchung eignete, entnahmen wir von drei Leichen (PMI der Leiche 1 = 81,75 h; PMI der Leiche 2 = 61,75 h; PMI der Leiche 3 = 91,0 h) neben Herzblut zusätzlich Glaskörperflüssigkeit. Glaskörperflüssigkeit und Blut wurden wie unter 3.2.2 beschrieben untersucht.

Anhand der Ergebnisse ist erkennbar, dass die Konzentrationen an Nicotinamid und Uracil bei den drei untersuchten Leichen in Glaskörperflüssigkeit deutlich niedriger als in Herzblut waren (Tabelle 8). Thymin war bei keiner der drei Leichen nachweisbar. Mit dem t-Test für gepaarte Stichproben konnten für Nicotinamid und Uracil in Glaskörperflüssigkeit signifikant geringere Konzentrationen als im Blut nachgewiesen werden ($p_{\text{Nicotinamid}} = 0,041$; $p_{\text{Uracil}} = 0,049$).

Tabelle 8: Nicotinamid-, Thymin- und Uracilkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ Blut bzw. Glaskörperflüssigkeit von drei Leichen

| | Nicotinamid | | Thymin | | Uracil | |
|----------|-------------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | Blut | GK | Blut | GK | Blut | GK |
| Leiche 1 | 16,8 | 4,1 | 0,0 | 0,0 | 22,9 | 1,7 |
| Leiche 2 | 13,8 | 3,9 | 0,0 | 0,0 | 17,3 | 1,0 |
| Leiche 3 | 9,2 | 3,4 | 0,0 | 0,0 | 10,8 | 1,9 |

GK = Glaskörperflüssigkeit

3.3.2 Untersuchung des Einfriervorganges an Probandenbluten

Dadurch, dass wir die Leichenblute aus verschiedenen Instituten bezogen, konnte die Probenaufbereitung nicht sofort nach der Probengewinnung erfolgen. Um den Entnahmezustand der Proben möglichst zu bewahren, lagerten wir die Leichenblute deshalb bei -20°C .

Es galt zu prüfen, ob sich durch das Tieffrieren die Markersubstanzkonzentrationen veränderten. Der Versuch gab zugleich Antwort auf die Frage, ob bei -20°C gelagertes Probandenblut auch detektierbare Konzentrationen an Nicotinamid, Thymin und Uracil enthielt.

Es wurden fünf frisch entnommene Probandenblute sowie 17 Probandenblute, die davor bei -20°C aufbewahrt worden waren, wie in 3.2.2 beschrieben untersucht.

Bei den vorher nicht tiefgefrorenen Probandenbluten war keine der drei Markersubstanzen detektierbar.

Bei den tiefgefrorenen Bluten waren Thymin und Uracil ebenfalls nicht nachweisbar (Tabelle 12). Nicotinamid hingegen befand sich bei 15 der 17 untersuchten Probandenblute im nachweisbaren Bereich. Die mittlere Nicotinamidkonzentration der Probandenblute betrug 2,0 µg/ml Blut (Nicotinamidkonzentrationsspanne: 0,0 - 4,2 µg/ml Blut, Tabelle 12).

Mit dem durchgeführten Welch-Test konnte gezeigt werden, dass es durch den Vorgang des Einfrierens zu einer Erhöhung der Nicotinamidkonzentration in den mit unserem Verfahren nachweisbaren Bereich kommt ($p = 0,000$). Die Thymin- und Uracilkonzentrationen wurden durch das Tieffrieren nicht verändert.

3.3.3 Stabilität des biologischen Materials

Um die Lagerungsfähigkeit der Blute nach vollendetem Einfriervorgang zu prüfen, untersuchten wir, ob die Konzentrationen der Markersubstanzen nach unterschiedlich langer Lagerung bei -20°C konstant blieben. Als Untersuchungsmaterial dienten drei Leichenblute, die wir zu je $14 \times 0,25$ ml aliquotierten und bei -20°C lagerten. Zwei Aliquots pro Blut wurden sofort, nach nur sechsstündiger Lagerung bei -20°C , untersucht. Von den anderen erfolgte im 8-Wochen-Abstand jeweils die Untersuchung von je zwei Aliquots pro Blut entsprechend 3.2.2, bis alle Aliquots aufgebraucht waren.

Die acht-wöchentlich gemessenen Substanzkonzentrationen ($N = 7$) veränderten sich nicht nennenswert (Tabelle 9, Tabelle 10, Tabelle 11). Auf Grund der Ergebnisse des Friedman-Testes waren für alle drei Substanzen keine Konzentrationsänderungen nach abgeschlossenem Einfriervorgang anzunehmen ($p_{\text{Nicotinamid}} = 0,203$; $p_{\text{Thymin}} = 0,423$; $p_{\text{Uracil}} = 0,295$).

3.3.4 Untersuchung der Leichenblute mit bekanntem PMI

Nachdem Methodenoptimierung und notwendige Vorversuchsserien abgeschlossen waren, wurde entsprechend der Zielstellung der Arbeit geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Markersubstanzkonzentrationen und der Leichenliegezeit existiert. Dazu erfolgte die Untersuchung von Leichenbluten mit bekannter Sterbezeit. Die Konzentrationen der Markersubstanzen ermittelten wir entsprechend 3.2.2.

Zunächst wurden separat die Leichenblute aus dem Rechtsmedizinischen und dem Pathologischen Institut der FSU Jena statistisch ausgewertet (N = 39), da bei diesen der gesicherte Todeszeitpunkt den Sektionsprotokollen entnommen worden war. Danach erfolgten die statistischen Berechnungen für die Leichenblute aus dem Rechtsmedizinischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (N = 30), bei denen ein weitestgehend gesicherter Todeszeitpunkt vorlag. (Entnahme der Sterbestunde aus den Totenscheinen.) Abschließend werteten wir aller Leichenblute ($N_{\text{gesamt}} = 69$) gemeinsam aus.

3.3.4.1 Leichenblute mit gesichertem Todeszeitpunkt (Sektionsprotokoll)

Bei den Leichenbluten mit gesichertem Todeszeitpunkt (Sektionsprotokoll, N = 39) reichte das postmortale Intervall von 23,25 bis 202,00 h. Es fanden sich Nicotinamidkonzentrationen von 0,0 - 19,5 µg/ml Blut, Thyminkonzentrationen von 0,0 - 7,8 µg/ml Blut und Uracilkonzentrationen von 5,0 – 167,7 µg/ml Blut (Tabelle 13).

Bei einfach-linearer Darstellung des postmortalen Intervalls in Abhängigkeit von den Markersubstanzkonzentrationen war kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen ersichtlich (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10).

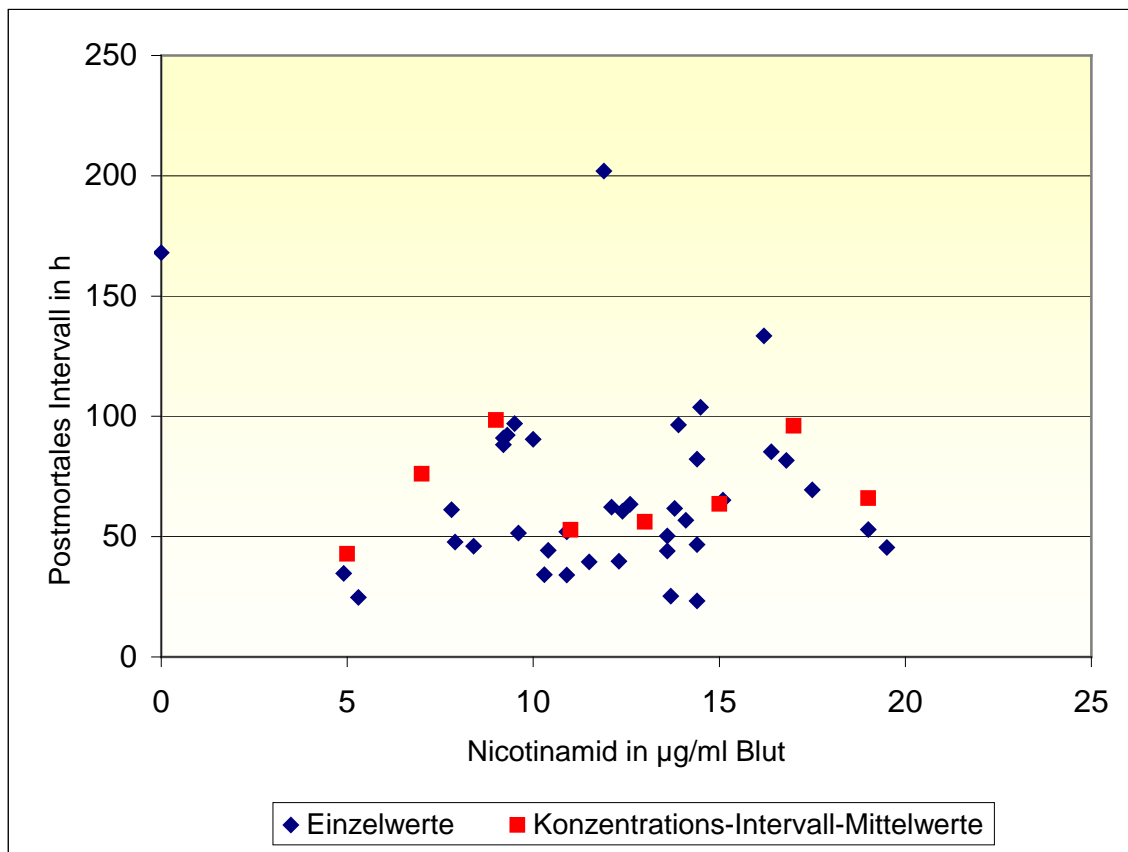


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen PMI und Nicotinamidkonzentration der Leichen mit gesichertem Todeszeitpunkt (N = 39)

Um in den Punktwolken einen möglichen Kurvenverlauf erkennbar zu machen, untergliederten wir die jeweilige Markersubstanz-Achse in Abschnitte definierter Größe. Für Nicotinamid wählten wir dabei eine Konzentrations-Intervallgröße von 2 $\mu\text{g/ml}$ Blut, für Thymin von 1 $\mu\text{g/ml}$ Blut und für Uracil von 10 $\mu\text{g/ml}$ Blut. Aus den PMI-Werten aller Messwertpaare, deren Stoffkonzentrationen in einem bestimmten Konzentrations-Intervall lagen, wurde der PMI-Mittelwert für dieses Konzentrations-Intervall gebildet und somit eine grobe Glättung der möglichen Kurve durchgeführt. Die so erzeugten Konzentrations-Intervall-Mittelwert-Kurven zeichneten wir zusätzlich in die Streudiagramme ein (Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10).

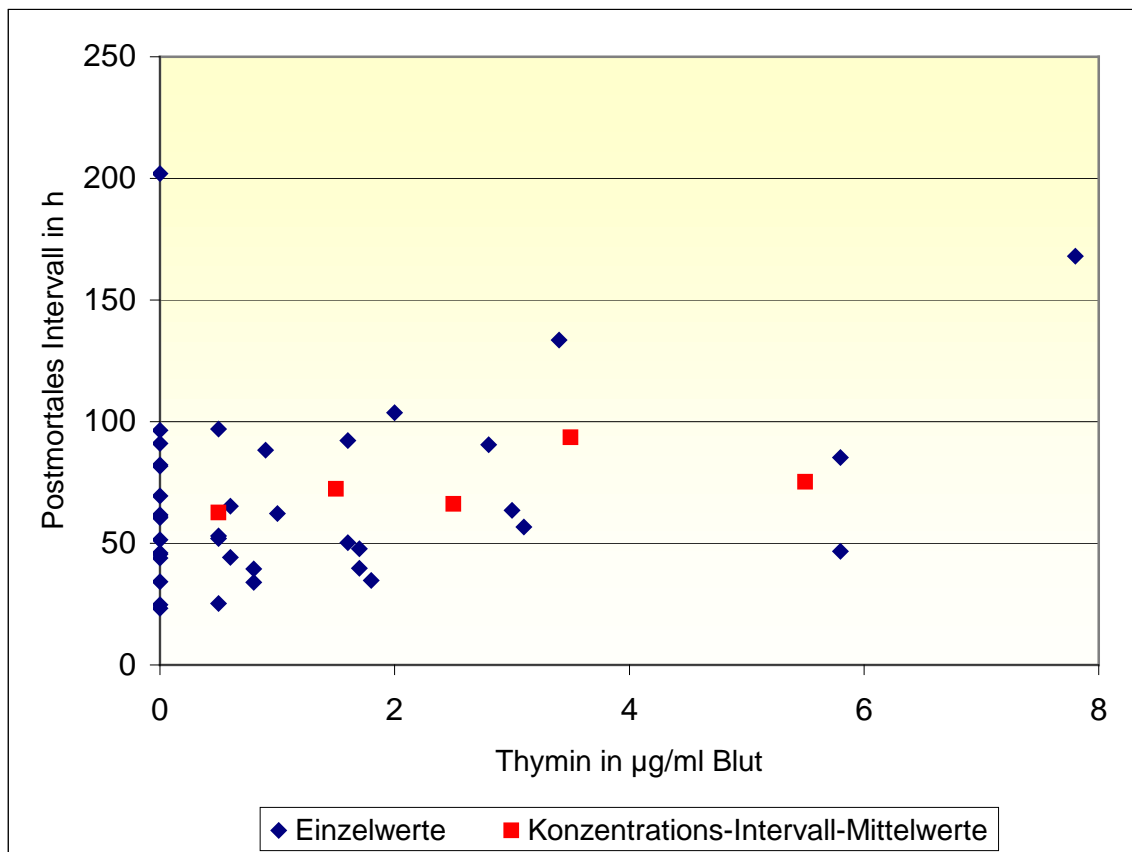


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen PMI und Thyminkonzentration der Leichen mit gesichertem Todeszeitpunkt (N = 39)

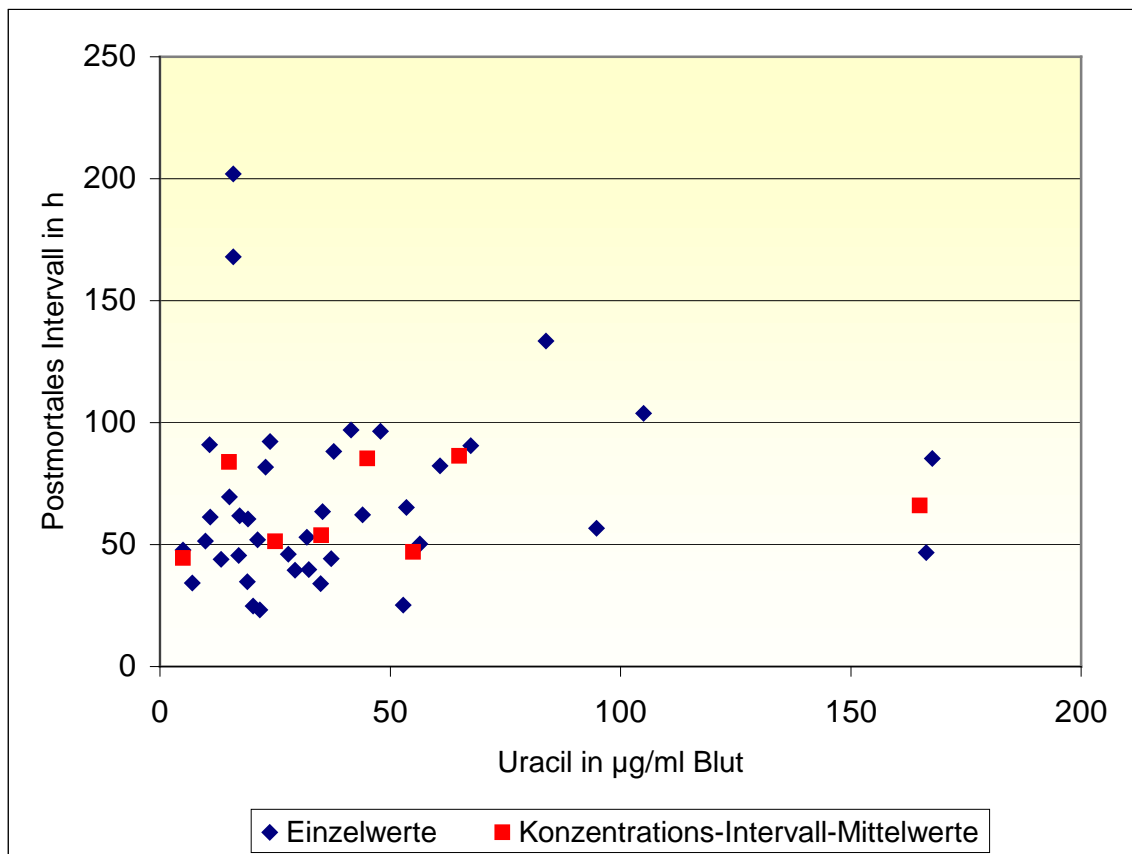


Abbildung 10: Zusammenhang zwischen PMI und Uracilkonzentration der Leichen mit gesichertem Todeszeitpunkt (N = 39)

Der Verlauf dieser Mittelwertkurven entsprach am ehesten einer Geraden. Deswegen wurde mittels einfacher und multipler linearer Regressionsanalyse auf einen linearen Zusammenhang geprüft.

Zum besseren Vergleich erfolgten die graphischen Darstellungen für die separat ausgewerteten Leichenblute mit gesichertem (Sektionsprotokoll) und die separat ausgewerteten Leichenblute mit weitestgehend gesichertem (Totenschein) Todeszeitpunkt in gemeinsamen Abbildungen (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Die zugehörigen Regressionsgeraden wurden mit eingezeichnet.

Für Nicotinamid ergab sich bei den Leichenbluten mit gesichertem Todeszeitpunkt (Sektionsprotokoll) die Regressionsgleichung $\text{PMI (in h)} = -1,07 \cdot [\text{Nicotinamid}] + 80,7$ mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,012$ (Abbildung 11). Für Thymin lautete die Gleichung $\text{PMI (in h)} = 6,73 \cdot [\text{Thymin}] + 59,5$. Das zugehörige Bestimmtheitsmaß betrug $R^2 = 0,109$ (Abbildung 12). Bei Uracil erhielten wir die Gleichung $\text{PMI (in h)} = 0,09 \cdot [\text{Uracil}] + 64,1$ mit $R^2 = 0,009$ (Abbildung 13). Die multiple lineare Regressionsanalyse mit allen drei Marker-substanzen ergab exakt dieselbe Regressionsgleichung wie die einfache lineare Regressionsanalyse von Thymin.

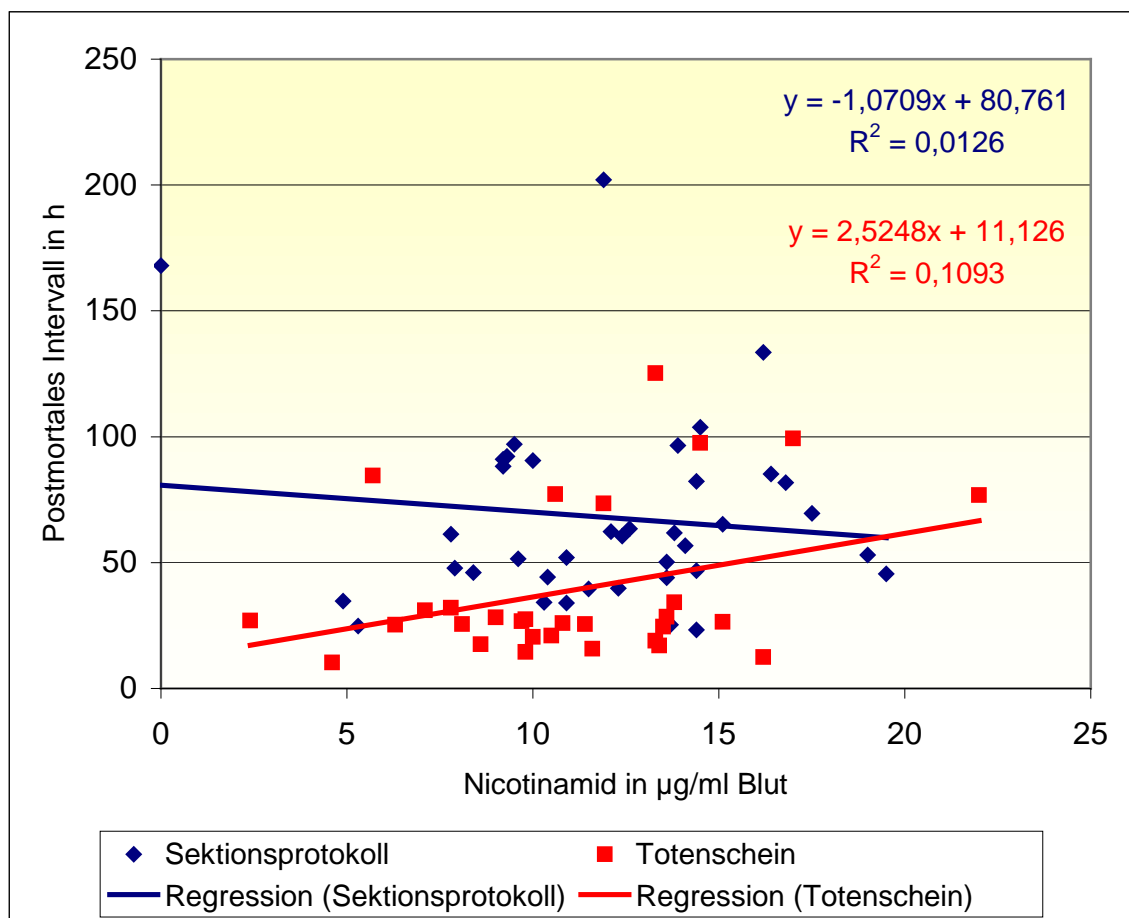


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen PMI und Nicotinamidkonzentration

Sektionsprotokoll = gesicherter Todeszeitpunkt (N = 39)

Totenschein = weitestgehend gesicherter Todeszeitpunkt (N = 30)

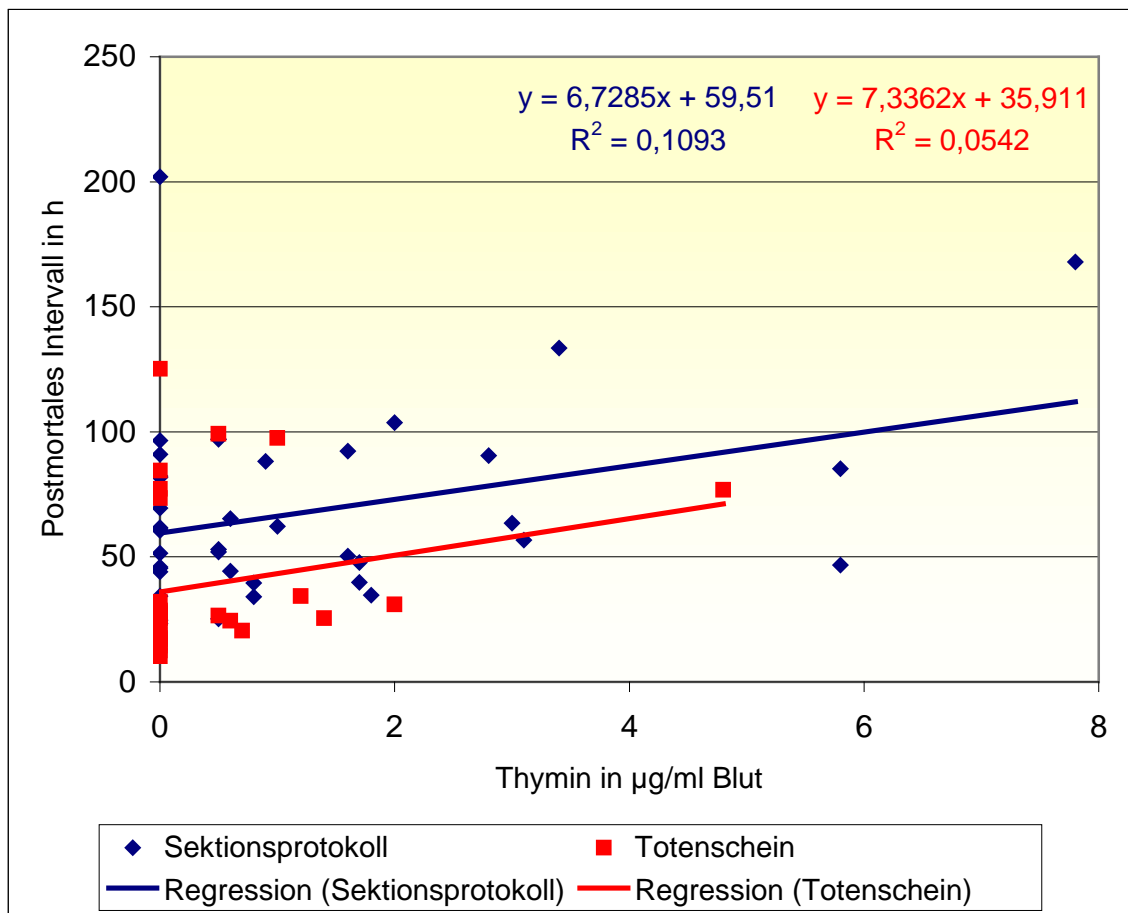


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen PMI und Thyminkonzentration

Sektionsprotokoll = gesicherter Todeszeitpunkt (N = 39)

Totenschein = weitestgehend gesicherter Todeszeitpunkt (N = 30)

3.3.4.2 Leichenblute mit weitestgehend gesichertem Todeszeitpunkt (Totenschein)

Bei den Leichenbluten mit weitestgehend gesichertem Todeszeitpunkt (Totenschein, N = 30) reichte das postmortale Intervall von 10,25 bis 125,25 h. Es fanden sich Nicotinamidkonzentrationen von 2,4 - 22,0 µg/ml Blut, Thyminkonzentrationen von 0,0 - 4,8 µg/ml Blut und Uracilkonzentrationen von 1,7 - 72,5 µg/ml Blut (Tabelle 14).

Bei einfach-linearer Darstellung des postmortalen Intervalls in Abhängigkeit von den Markersubstanzkonzentrationen war ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den aufgetragenen Variablen erkennbar. Auf die graphische Darstellung der Streudiagramme wird an dieser Stelle verzichtet. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte wie bei den Leichenbluten, deren Todeszeitpunkt den Sektionsprotokollen entstammte.

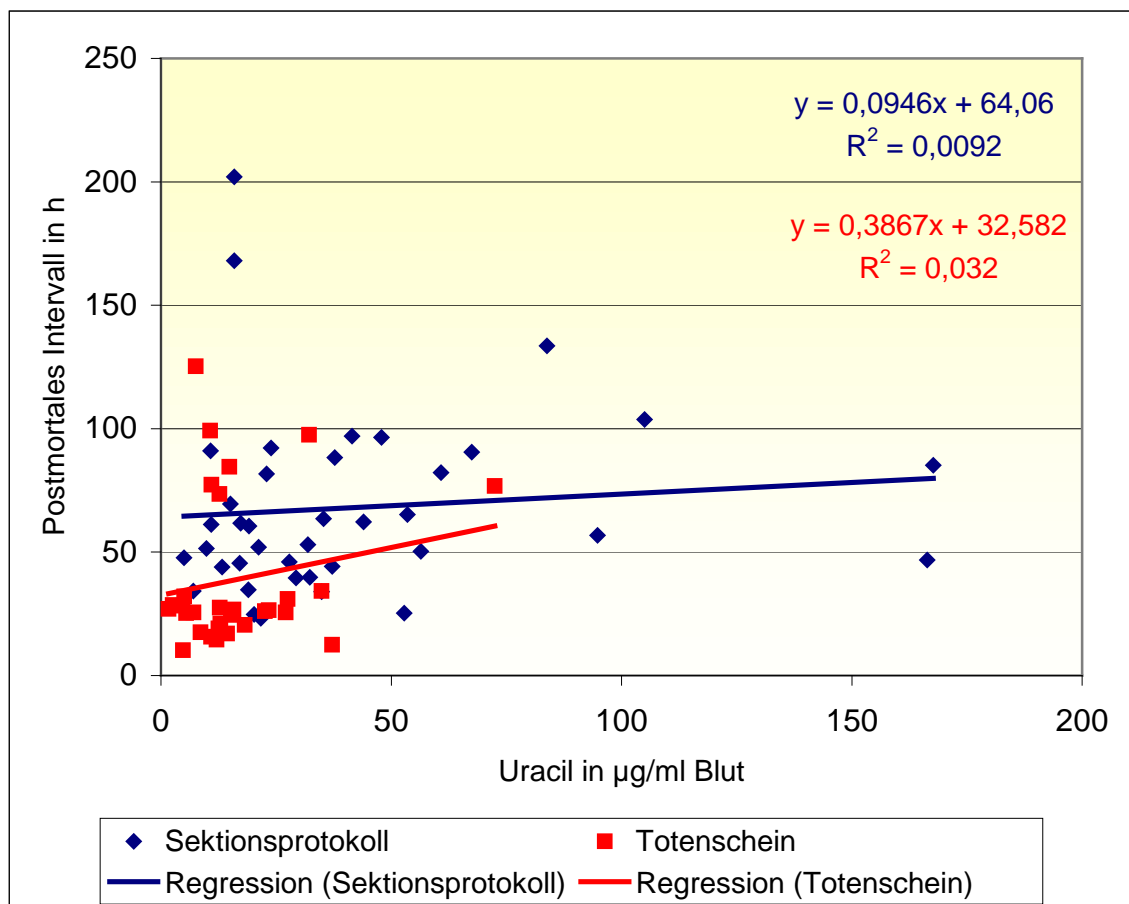


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen PMI und Uracilkonzentration

Sektionsprotokoll = gesicherter Todeszeitpunkt (N = 39)

Totenschein = weitestgehend gesicherter Todeszeitpunkt (N = 30)

Die Regressionsgleichung für Nicotinamid lautete PMI (in h) = $2,52 \cdot [\text{Nicotinamid}] + 11,1$ mit $R^2 = 0,109$, für Thymin PMI (in h) = $7,34 \cdot [\text{Thymin}] + 35,9$ mit

$R^2 = 0,054$ und für Uracil PMI (in h) = $0,39 \cdot [\text{Uracil}] + 32,6$ mit $R^2 = 0,032$ (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Die multiple lineare Regressionsanalyse mit allen drei Substanzen ergab erneut exakt dasselbe Resultat wie die einfache lineare Regressionsanalyse von Thymin.

3.3.4.3 Gemeinsame Auswertung aller Leichenblute

Das postmortale Intervall aller untersuchten 69 Leichenblute reichte von 10,25 bis 202,00 h. Es fanden sich Nicotinamidkonzentrationen von 0,0 - 22,0 µg/ml Blut, Thyminkonzentrationen von 0,0 - 7,8 µg/ml Blut und Uracilkonzentrationen von 1,7 – 167,7 µg/ml Blut. Uracil war als einzige Substanz bei allen Leichenbluten nachweisbar (Tabelle 13, Tabelle 14).

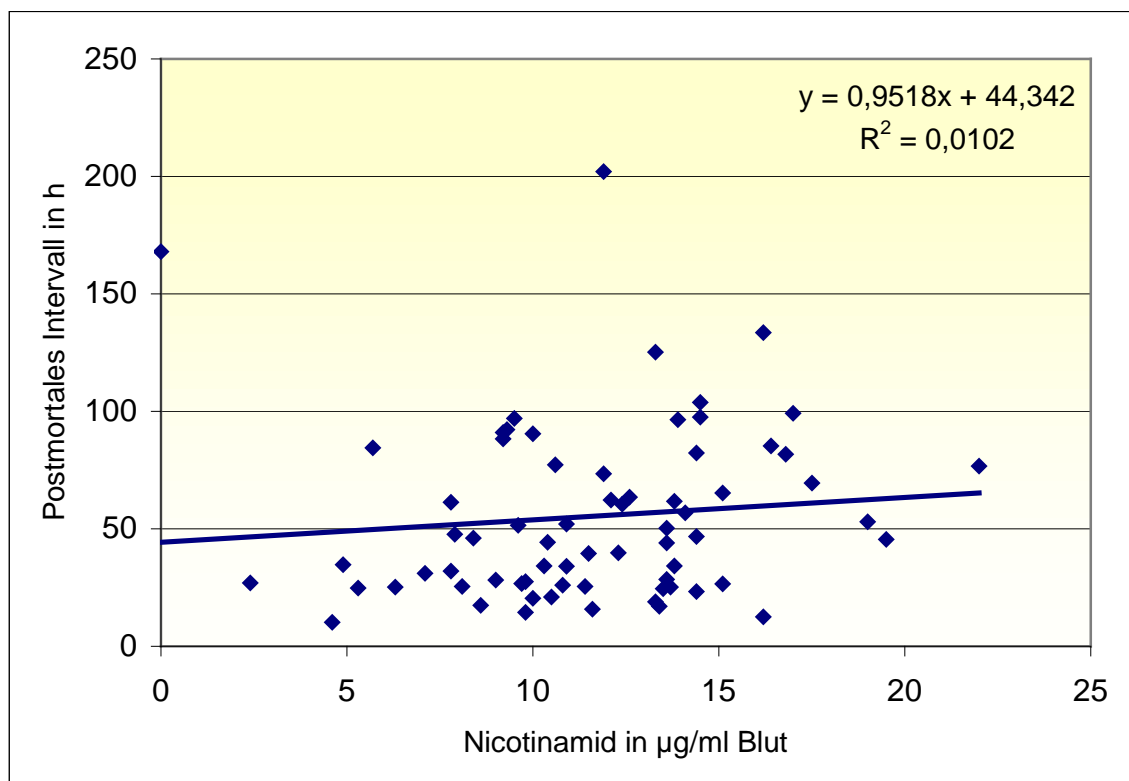


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen PMI und Nicotinamidkonzentration
Gemeinsame Auswertung aller Leichenblute (N = 69)

Für die gemeinsame Auswertung aller untersuchten Leichenblute (N = 69) wurde ebenfalls wie schon oben beschrieben vorgegangen. Für Nicotinamid ergab sich die Regressionsgleichung PMI (in h) = 0,95 * [Nicotinamid] + 44,3 mit dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,010$ (Abbildung 14). Für Thymin berechnete sich das PMI aus der Gleichung PMI (in h) = 8,79 * [Thymin] + 47,5 (Abbildung 15). Das Bestimmtheitsmaß betrug $R^2 = 0,137$. Die Gleichung mit Uracil lautete PMI (in h) = 0,27 * [Uracil] + 47,0 mit $R^2 = 0,056$ (Abbildung 16). Bei der multiplen linearen Regressionsanalyse mit allen drei Markersubstanzen erhielt man exakt dieselbe Regressionsgleichung wie bei der einfachen linearen Regressionsanalyse von Thymin.

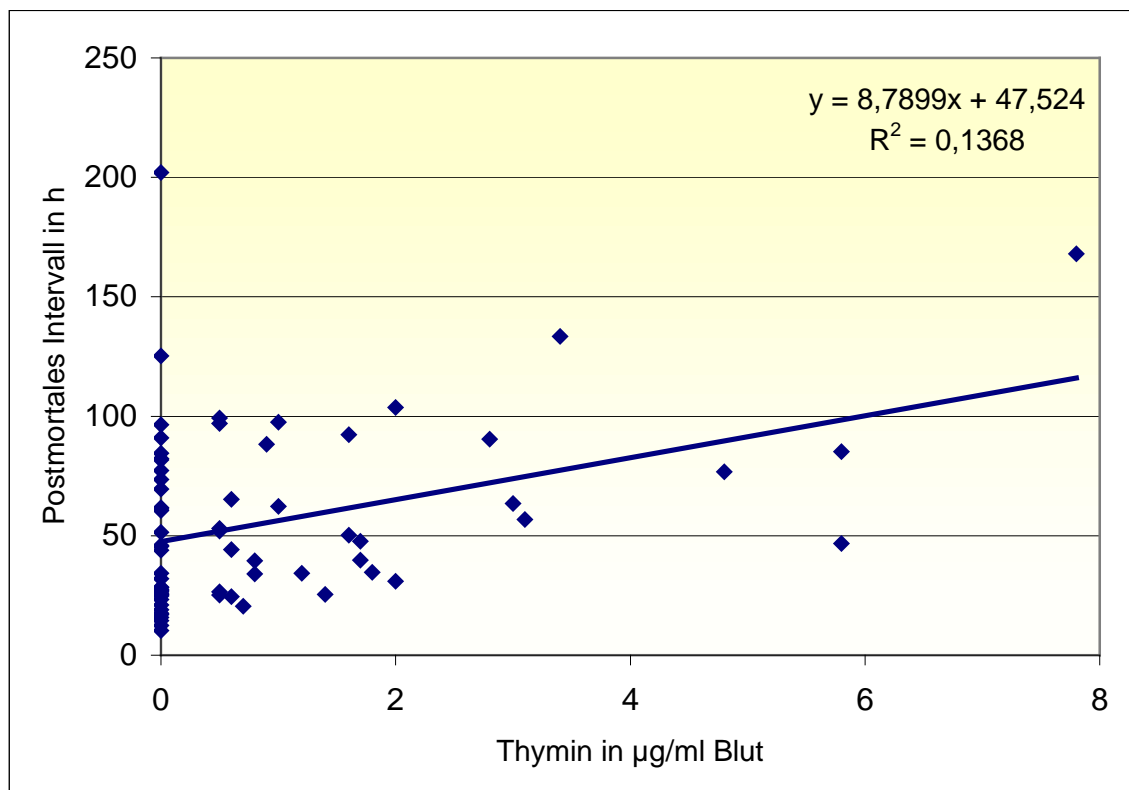


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen PMI und Thyminkonzentration
Gemeinsame Auswertung aller Leichenblute (N = 69)

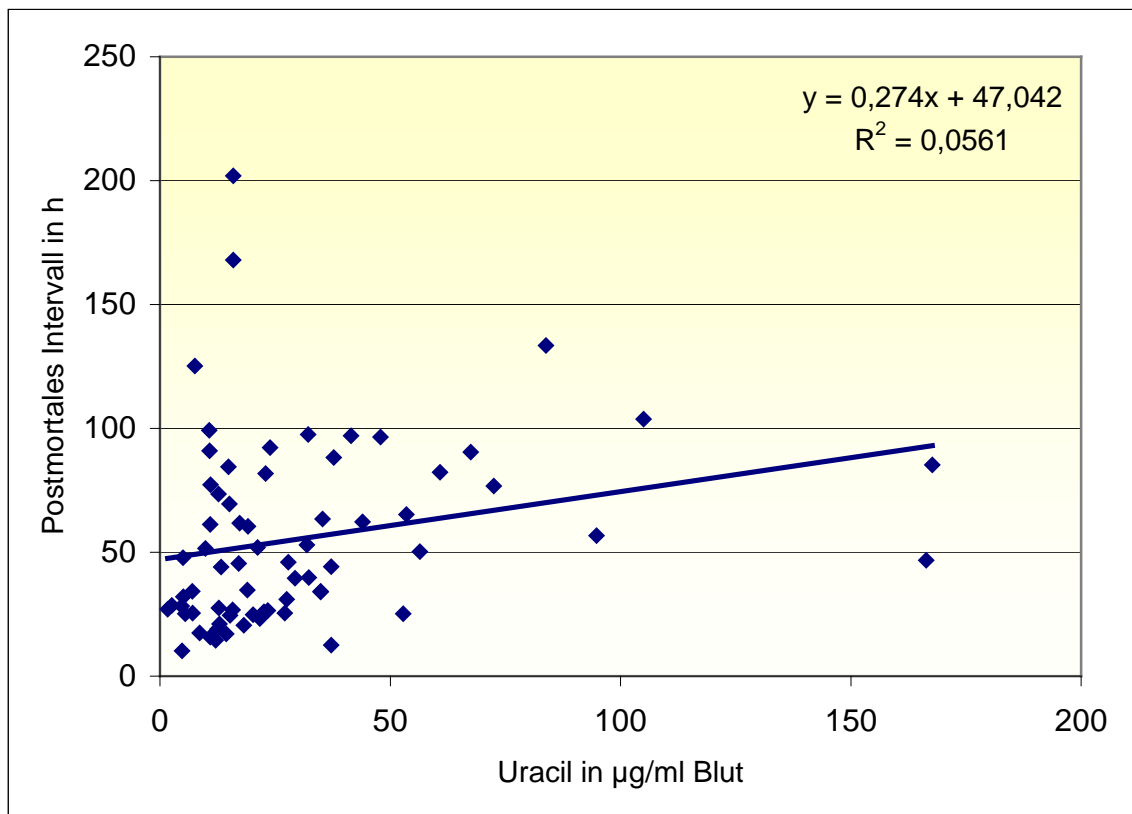


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen PMI und Uracilkonzentration
Gemeinsame Auswertung aller Leichenblute (N = 69)

4 Diskussion

4.1 Zur Entwicklung der Analysenmethode

Die drei zu untersuchenden Markersubstanzen wurden von uns als Nicotinamid, Thymin und Uracil identifiziert. Den Nachweis erbrachten wir, indem wir aufzeigten, dass die Markersubstanzen im direkten Vergleich mit Nicotinamid, Thymin und Uracil sowohl in den Remissionsspektren als auch in den Wanderungsgeschwindigkeiten in zwei verschiedenen Laufmitteln übereinstimmen.

KAEMPE hatte diese drei Substanzen schon 1967 beschrieben, nachdem er wiederholt bei der spektrophotometrischen Analyse auf Alkaloide an Leichenmaterial auf sie gestoßen war (KAEMPE 1967). In seiner Arbeit beschrieb er sowohl ihre Isolierung und Identifikation als auch ihre analytischen Eigenschaften, führte jedoch keine weiteren Versuche im Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung für die Todeszeitbestimmung durch.

Bei den Extraktionsversuchen, die wir zum Zweck der optimalen Gestaltung der Flüssig-Flüssig-Extraktion durchführten, zeigte sich, dass aus der Verwendung von Ethylacetat als Extraktionsmittel höhere Extraktionsausbeuten als aus der Verwendung von Dichlormethan resultierten. Dieses Ergebnis spiegelt den molekularen Aufbau der drei zu extrahierenden Markersubstanzen wider.

Nicotinamid, Thymin und Uracil besitzen durch einen Pyrimidin- bzw. Pyridinring einerseits lipophile und durch Carbonyl- und Amidgruppen andererseits hydrophile Eigenschaften (Abbildung 1, LÖFFLER und PETRIDES 1998a und d). Dichlormethan stellt im Gegensatz zum Ethylacetat, das durch eine Carbonylgruppe gewisse polare Eigenschaften besitzt, ein stärker hydrophobes Extraktionsmittel dar (KARLSON et al. 1994). Gemäß dem Leitsatz „Gleiches löst sich in Gleichem“, ist Ethylacetat deshalb befähigt, größere Mengen der Markersubstanzen aufzunehmen (ZEECK et al. 2000).

Auf Grund dieses Resultates arbeiteten wir nachfolgend nur noch mit Ethylacetat als Extraktionsmittel.

Des Weiteren zeigte sich bei den Extraktionsversuchen, dass der pH-Wert der hydrophilen Phase die Extraktionsausbeuten nur unwesentlich beeinflusst, dass jedoch gleichzeitig dem Phasenverhältnis zwischen hydrophiler und lipophiler Phase eine große Bedeutung zukommt.

In Übereinstimmung mit dem Nernstschen Verteilungsgesetz, kann um so mehr Markersubstanz extrahiert werden, um so größer der Überschuss an lipophilem Extraktionsmittel ist (ZEECK et al. 2000). Dies kann der Abbildung 17 entnommen werden. Die extrahierte Substanzmenge entspricht der Substanzmenge in der lipophilen Phase ($= m_{\text{(lipophil)}}$). Diese ist um so größer, um so kleiner die hydrophile Phase ist ($= V_{\text{(hydrophil)}}$) ist.

$$K = \frac{C_{\text{(lipophile Phase)}}}{C_{\text{(hydrophile Phase)}}} = \frac{m_{\text{(lipophile Phase)}} * V_{\text{(hydrophile Phase)}}}{V_{\text{(lipophile Phase)}} * m_{\text{(hydrophile Phase)}}}$$
$$m_{\text{(lipophile Phase)}} = \frac{K * V_{\text{(lipophile Phase)}} * m_{\text{(hydrophile Phase)}}}{V_{\text{(hydrophile Phase)}}}$$

Abbildung 17: Nernstsches Verteilungsgesetz (ZEECK et al. 2000)

(K ... Nernstscher Verteilungskoeffizient; c ... Konzentration;
m ... Masse; V ... Volumen)

Da durch die Einstellung eines bestimmten pH-Wertes die Extraktionsausbeuten kaum verbessert werden, man zur Einstellung eines bestimmten pH-Wertes jedoch Puffer hätte zusetzen müssen und damit das Phasenverhältnis ungünstig beeinflusst hätte, verzichteten wir auf diesen sonst üblichen Arbeitsschritt.

Zur Charakterisierung unserer Bestimmungsmethode ermittelten wir die Tag-zu-Tag Präzision. Die Variationskoeffizienten, als Maß der Präzision, betrugen dabei maximal 13,3%.

In der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen sind in Abhängigkeit von Matrix und Messbereich des Analyten zulässige Grenzwerte der Unpräzision von bis zu 15% (IgA und IgM im Liquor) festgelegt (BUNDESÄRZTEKAMMER 2001). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den dort aufgeführten Analyten um Routinebestimmungen handelt und dass die festgelegten Grenzwerte sich an den technischen Möglichkeiten und klinischen Erfordernissen orientieren, erscheint uns die bei unserem Verfahren vorliegenden Unpräzision vertretbar.

Wesentlichen Einfluss auf die Präzision unserer Methode dürften Pipettierfehler, Fehler beim Lösen des eingedampften Extraktionsrückstandes und Ungenauigkeiten beim Auftragevorgang auf die DC-Platte haben. Auch eine unterschiedliche Verteilung der dünnenschichtchromatographisch getrennten Substanzen in der Trennschicht der DC-Platte erniedrigt die Präzision der Konzentrationsbestimmung.

An dieser Stelle soll nochmals darauf eingegangen werden, warum wir uns trotzdem der Dünnschichtchromatographie bedienten. Der offenkundigste Vorteil der Dünnschichtchromatographie mit UV-spektrometrischer Detektion liegt in der Möglichkeit mehrere Proben parallel auswerten zu können. Auf Grund dessen handelt es sich um ein sehr preiswertes Verfahren. Zudem waren die notwendigen Apparaturen im Institut für Rechtsmedizin vorhanden.

Für die high performance liquid chromatography (HPLC) mit UV-spektrometrischer Detektion, die sich ebenfalls zur Bestimmung der Marker-substanzen anbot, standen leider die nötigen Apparaturen nicht zur Verfügung. Mit ihr wäre vermutlich eine höhere Präzision erreichbar gewesen, da Auftragefehler und Unterschiede zwischen den Trennphasen (DC-Platten) keine Rolle spielen.

Die Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) barg den Nachteil, dass die von uns untersuchten polaren Substanzen underivatisiert nicht bzw.

nur unzureichend in die gasförmige Phase überführt werden können. Ein zusätzlicher Derivatisierungsschritt hätte den Zeitaufwand wesentlich erhöht. Eine höhere Genauigkeit im Vergleich zur Dünnschichtchromatographie wäre nur durch den Einsatz von deuterisierten Standards erreichbar gewesen, was wieder zu hohen Kosten geführt hätte.

Entsprechend den obigen Ausführungen bot sich die Dünnschichtchromatographie als einfachste Option an.

Die ermittelten Nachweisgrenzen und die Präzision waren für unsere Fragestellung ausreichend. Mit dieser Arbeit, die als Art Pilotstudie gedacht war, sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Marker-substanzkonzentrationen und dem PMI existiert. Solch ein Zusammenhang wäre mit unserer Methode aufdeckbar.

Im Falle von vielversprechenden Ergebnissen könnte mit exakteren, aber auch aufwendigeren Bestimmungsmethoden an diese Arbeit angeschlossen werden.

4.2 Diskussion zur Untersuchung des biologischen Materials

4.2.1 Glaskörperflüssigkeit als Untersuchungsmaterial

Wie unter 1.1.3 dargestellt, konnte bis heute bei Untersuchungen an Körpergeweben und –flüssigkeiten kein für die Todeszeitbestimmung geeigneter Zusammenhang zwischen den geprüften Parametern und der Leichenliegezeit gefunden werden. Am vielversprechensten erschien bei diesen Untersuchungen noch die Glaskörperflüssigkeit, weshalb wir prüfen wollten, ob sie sich zur Bestimmung unserer Markersubstanzen ebenfalls eignete.

Schon COE wies darauf hin, dass die Glaskörperflüssigkeit der Leiche ein hervorragendes Untersuchungsmaterial darstellt (COE 1974). Durch die anatomische Lage geschützt, ist sie häufig selbst bei schwer kopfverletzten Leichen noch zu gewinnen. Eine Verunreinigung durch Blut wie beim Liquor und durch Bakterien tritt selten auf.

Als zellarmes, gefäßloses und bradytrophes Gewebe laufen im Glaskörper Prozesse der Autolyse und Fäulnis viel langsamer als in Blut und Liquor ab (COE 1974, JAMES et al. 1997). Auf Grund dieser zeitlichen Verzögerung im Ablauf vieler Prozesse vergrößert sich das Zeitfenster, in dem durch Bestimmungen an Glaskörperflüssigkeit Informationen zur Berechnung der Leichenliegezeit gewonnen werden können (JAMES et al. 1997).

In der Glaskörperflüssigkeit scheint zudem die Streuung vieler Befunde geringer als in anderen Körperflüssigkeiten zu sein, was einen weiteren immensen Vorteil darstellt. Auf Grund dessen führte man in den letzten Jahrzehnten viele Untersuchungen an Glaskörperflüssigkeit durch.

Dabei stellten sich die Kalium- und die Hypoxanthinkonzentration als am vielversprechendsten für die Todeszeitbestimmung heraus. So fanden KRAUSE et al. eine exponentielle Abhängigkeit der Kaliumkonzentration von der Leichenliegezeit mit $r = 0,70$ (KRAUSE et al. 1971). Unter der Voraussetzung einer Agoniedauer < 6 h und einer Harnstoffkonzentration im Glaskörper < 100 mg/dl konnten MADEA und HENßGE einen linearen Zusammenhang der Kaliumkonzentration zum PMI mit $r = 0,955$ aufzeigen (MADEA und HENßGE 1987). Einen vergleichbar engen Zusammenhang von Kaliumkonzentration und PMI von $r = 0,95$ konnten auch TAGLIARO et al. feststellen (TAGLIARO et al. 1999). JAMES et al. favorisierten die gemeinsame Auswertung der Kalium- und der Hypoxanthinkonzentration, während MADEA et al. in ihrer Arbeit hervorhoben, dass sich durch die Kaliumbestimmung ein viel höherer Informationsgewinn als durch die Hypoxanthinbestimmung ergibt (JAMES et al. 1997, MADEA et al. 1994).

Trotz der z. T. sehr hohen Korrelationskoeffizienten kam es wegen der starken Messwertstreuung nicht zu einer praktischen Anwendung dieser Ergebnisse.

Wie die obigen Ausführungen zeigen, stellt die Glaskörperflüssigkeit ein sehr interessantes Untersuchungsmedium dar. Inwieweit sie sich für die aktuelle Problemstellung eignete, sollte durch die Bestimmung der Markersubstanzen in der Glaskörperflüssigkeit dreier Leichen geklärt werden. Die Leichenliegezeit

betrug für Leiche 1 = 81,75 h, für Leiche 2 = 61,75 h und für Leiche 3 = 91,0 h. Für den Großteil der Leichenliegezeit erfolgte die Lagerung im Kühlraum des Rechtsmedizinischen Instituts bei einer mittleren Umgebungstemperatur von 4°C.

Nicotinamid und Uracil waren sowohl im Blut als auch in der Glaskörperflüssigkeit der untersuchten Leichen nachweisbar. Thymin war weder im Blut noch in der Glaskörperflüssigkeit aufzufinden.

In Untersuchungen an Glaskörperflüssigkeit von Hühnern und Schweinen konnten GARDINER et al. Thymin bei Lagerungstemperaturen von 6°C erst nach 120 h p.m. nachweisen (GARDINER et al. 1989).

In den eigenen Untersuchungen am Herzblut der 69 Leichen konnte Thymin z. T. schon 20,5 h p.m. nachgewiesen werden. Es existierten jedoch auch Fälle bei denen bei einem PMI > 91 h Thymin nicht nachweisbar war (Tabelle 13, Tabelle 14).

Dass bei den drei hier untersuchten Bluten mit einem maximalen PMI von 91 h Thymin nicht auffindbar war, passt somit sowohl zu Gardiners als auch zu den eigenen Resultaten.

In der oben erwähnten Untersuchung aus dem Jahr 1989 an Glaskörperflüssigkeit von Hühnern und Schweinen konnten GARDINER et al. Uracil zum Zeitpunkt „0 h p.m.“ nachweisen, wobei eine im Zeitraum von 0 – 30 min p.m. erfolgte Materialentnahme als „0 h p.m.-Materialentnahme“ definiert wurde (GARDINER et al. 1989). In einer Folgeuntersuchung an Hühner-Glaskörperflüssigkeit definierten sie „0 h p.m.“ als eine Materialentnahme ausschließlich innerhalb der ersten 3 min p.m.. Zum Zeitpunkt „0 h p.m.“ konnten sie nun Uracil nicht detektieren. Erst 24 h p.m. war Uracil in dieser zweiten Untersuchung nachweisbar (GARDINER et al. 1990).

COUDE und KAMOUN untersuchten Liquor bzw. Blut von Probanden und von plötzlich verstorbenen Kleinkindern (COUDE und KAMOUN 1992). Hierbei war

Uracil nur im Material von Verstorbenen nachzuweisen. Die Uracilkonzentration im Blut stieg mit zunehmendem PMI an, wobei COUDE nur das frühe PMI bis einschließlich 10 h p.m. untersuchte. 10 h p.m. war Uracil in 90% seiner untersuchten Fälle nachweisbar.

Dass bei unseren Untersuchungen Uracil immer nachweisbar war, deckt sich insofern mit diesen Ergebnissen, als dass bei uns alle Blute deutlich längere PMI als 10 h aufwiesen.

Auf Grund des schon diskutierten Fehlens von Thymin konnten nur die Konzentrationen an Nicotinamid und Uracil in Glaskörperflüssigkeit und Blut verglichen werden. Es zeigte sich, dass die Nicotinamid- und Uracilkonzentrationen in der Glaskörperflüssigkeit signifikant niedriger als im Blut waren ($p_{\text{Nicotinamid}} = 0,041$; $p_{\text{Uracil}} = 0,049$).

Für die Konzentrationsbestimmung der Markersubstanzen in der Glaskörperflüssigkeit mit unserer Methode war die deutlich geringere Stoffkonzentration im Vergleich zum Blut ungünstig. Geringfügige Erhöhungen der Markersubstanzkonzentrationen, die im Blut gerade noch detektierbar wären, könnten in der Glaskörperflüssigkeit mit unserem Verfahren nicht nachgewiesen werden.

Außerdem erschwerten zusätzliche, im Blut nicht auftretende, Störsubstanzen die densitometrische Auswertung bei der Glaskörperflüssigkeit.

Wegen diesen Ergebnissen entschieden wir uns, trotz der oben beschriebenen Vorteile der Glaskörperflüssigkeit keine weiterführenden Untersuchungen mit ihr durchzuführen.

4.2.2 Lagerungsfähigkeit des Blutes

Da wir die Leichenblute aus verschiedenen Instituten bezogen, konnte die Probenaufbereitung nicht immer sofort nach der Probengewinnung durchgeführt werden. Dementsprechend musste eine Lagerung erfolgen, die möglichst den Entnahmezustand der Proben bewahrte. Die Lagerung bei -20°C erschien uns geeignet.

Um zu prüfen, inwieweit sich das Blut bei dieser Lagerung veränderte, führten wir zwei Versuche durch. Beim ersten untersuchten wir anhand von 17 Probandenbluten den Vorgang des Tieffrierens. Beim zweiten wurde nach vollendetem Tieffriervorgang geprüft, ob die drei Markersubstanzen über einen längeren Zeitraum bei – 20°C stabil blieben.

Im ersten Versuch konnte mit dem durchgeführten Welch-Test gezeigt werden, dass es durch den Vorgang des Einfrierens zu einer Erhöhung der Nicotinamidkonzentration in den mit unserem Verfahren nachweisbaren Bereich kommt ($p = 0,000$). Die Thymin- und Uracilkonzentrationen wurden durch das Tieffrieren nicht verändert.

Im zweiten Versuch ergab sich, dass entsprechend den Ergebnissen des durchgeführten Friedman-Testes keine Änderungen der Markersubstanzkonzentrationen nach vollendetem Tieffriervorgang bei – 20°C anzunehmen sind. Diese Lagerungsstabilität konnte für einen Zeitraum von einem Jahr gezeigt werden.

Für den gesamten Vorgang der Lagerung bei – 20°C kann geschlossen werden, dass sich die Thymin- und Uracilkonzentrationen nicht verändern. Die Nicotinamidkonzentrationen werden hingegen durch den Vorgang des Tieffrierens erhöht. Dies hat Relevanz für das Ziel dieser Arbeit, einen Zusammenhang zwischen den Markersubstanzkonzentrationen und dem PMI aufzudecken, denn die gemessenen Nicotinamidkonzentrationen werden nicht nur durch das verstrichene PMI, sondern auch durch den Tieffriervorgang beeinflusst.

Da jedoch die Probenlagerung unumgänglich war, versuchten wir gleiche Bedingungen für alle Proben zu schaffen, indem wir alle zu untersuchenden Proben bei – 20°C lagerten. Zudem wäre es, falls eine Anwendung unserer Ergebnisse in der Praxis lohnenswert erschiene, für die Anwender attraktiver, wenn die Probenuntersuchung nicht sofort erfolgen müsste, sondern auch nach Lagerung der Proben möglich wäre.

4.2.3 Probandenblut

Wie oben beschrieben lagerten alle Leichenblute bis zur Untersuchung bei – 20°C. Bei dieser Lagerungsart kommt es in den Blutproben zur Hämolyse. Um Referenzwerte von Lebenden aus einem Untersuchungsmaterial zu gewinnen, das dem gelagerten Leichenblut vergleichbar ist, wurde das von Probanden gewonnene Vollblut (N = 17) nach der Entnahme ebenfalls bei – 20°C gelagert und erst danach untersucht. Thymin und Uracil waren in den hämolytischen Probandenbluten nicht detektierbar. Nicotinamid ließ sich bei 15 der 17 getesteten Probandenblute nachweisen. Die mittlere Nicotinamidkonzentration betrug 2,0 µg/ml Blut (Nicotinamidkonzentrationsspanne: 0,0 - 4,2 µg/ml Blut).

Zusätzlich prüften wir, ob und unter welchen Lagerungsbedingungen Nicotinamid, Thymin und Uracil mit unserem Verfahren in Probandenblut nachweisbar waren. Vollblut und Serum von fünf Probanden stand für den Versuch zur Verfügung (Anhang: 7.2 Probandenblute bei unterschiedlicher Lagerung). Bei jedem Probanden wurden beide Probenmaterialien sofort nach der Blutentnahme, sowie nach vierwöchiger Lagerung bei 4°C bzw. nach vierwöchiger Lagerung bei – 20°C untersucht.

Im sofort aufbereiteten Vollblut und Serum konnte keine der Markersubstanzen detektiert werden. Nicotinamid konnte bei einigen Probanden sowohl nach vierwöchiger Lagerung bei – 20°C als auch nach vierwöchiger Lagerung bei 4°C, jedoch nur im Vollblut und nicht im Serum, nachgewiesen werden (Tabelle 15). Thymin war bei keiner Untersuchung nachweisbar (Tabelle 16). Uracil fand sich nur bei einem Probanden nach Lagerung bei 4°C und ebenfalls nur im Vollblut und nicht im Serum (Tabelle 17).

Nicotinamid, auch als Niacinamid bezeichnet, wird dem Vitamin B2-Komplex zugeordnet (LÖFFLER und PETRIDES 1998c, Abbildung 1). Es kann im Stoffwechsel aus Tryptophan synthetisiert werden und ist essentieller Bestandteil

der wasserstoffübertragenden Coenzyme NAD^+ und NADP^+ (LÖFFLER und PETRIDES 1998d).

Bei Thymin und Uracil handelt es sich um Pyrimidinbasen, die Bestandteil des genetischen Materials sind. Thymin (2,4-Dihydroxy-5-methylpyrimidin, Abbildung 1) ist in DNA und t-RNA, Uracil (2,4-Dihydroxypyrimidin, Abbildung 1) ausschließlich in RNA enthalten (LÖFFLER und PETRIDES 1998a). Im lebenden Organismus werden sie im Intermediärstoffwechsel gebildet und hauptsächlich in der Leber zu Acetat bzw. Propionat, Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut (LÖFFLER und PETRIDES 1998b).

Nicotinamid und Uracil konnten wir mit unserem Bestimmungsverfahren nur im gelagerten bzw. eingefrorenen Vollblut nachweisen. In gelagertem bzw. eingefrorenem Serum waren beide Substanzen nie aufzufinden. Wir vermuten deshalb, dass diese Markersubstanzen oder ihre Vorläuferstoffe hauptsächlich den Zellen entstammen.

Die Tatsache, dass die Substanzen mit unserer Methode nicht in frischem Vollblut detektierbar waren, könnte dadurch erklärt werden, dass die intakten Zellmembranen den Nachweis der intrazellulären Stoffe verhinderten.

Im Gegensatz dazu kommt es sowohl beim Einfriervorgang auf -20°C als auch während der vierwöchiger Lagerung bei 4°C beim Vollblut zur Hämolyse, also zur Zerstörung der Zellmembranen, wodurch intrazelluläres Material freigesetzt und der Analyse zugänglich wird.

Uracil ließ sich, wie oben beschrieben, nach Lagerung bei -20°C nie und nur bei einem der untersuchten Probandenblute nach vierwöchiger Lagerung bei 4°C nachweisen.

Als RNA-Bestandteil muss Uracil wahrscheinlich aus dieser erst freigesetzt werden. Es ist davon auszugehen, dass dies auch postmortal größtenteils enzymatisch katalysiert geschieht. Da jegliche chemische Reaktion entsprechend der van't Hoff'schen Reaktionsgeschwindigkeit-Temperaturregel temperaturabhängig ist (FORSTER 1986b), die Temperaturabhängigkeit jedoch

im besonderen auf die enzymatisch katalysierten Reaktionen zutrifft, läuft der Prozess der Uracilfreisetzung bei – 20°C nicht bzw. nur sehr langsam, bei 4°C jedoch schneller ab. Dies könnte unser Untersuchungsergebnis erklären.

Bei Untersuchungen zur Differenzierung prä- und postmortalen Blutflecken stellten SUGIE et al. Uracil ausschließlich in postmortalen Blutflecken fest (SUGIE et al. 1995). Sie folgerten, dass das Uracil nicht den Erythrozyten, sondern nekrotischem Organgewebe entstamme.

In der aktuellen Untersuchung trat Uracil nach in vitro Lagerung bei einem Probandenblut auf, wobei in dem Probandenblut kein nekrotisches Organ- gewebe außer den Blutzellen enthalten war. Dass SUGIE et al. die kernlosen und an RNA armen Erythrozyten als Quelle des Uracils ausgeschlossen haben, erscheint begründet, jedoch wurden die Leukozyten nicht mit betrachtet. Das in vitro nachweisbare Uracil entstammt vielleicht dieser Zellpopulation.

Dass bei SUGIE et al. in den prämortalen Blutflecken kein Uracil nachweisbar war, obwohl auch dort Leukozyten enthalten waren, liegt vermutlich daran, dass, wie weiter oben beschrieben, Uracil erst enzymatisch freigesetzt werden muss. Da enzymatische Abläufe an Wasser gebunden sind, erfolgte in den getrockneten prämortalen Blutflecken kein bzw. ein nur sehr geringer Stoffumsatz. Bei den postmortalen Blutflecken hingegen war das Uracil vermutlich schon vor Erzeugung der Blutflecken, im noch wässrigen Zustand des Blutes, freigesetzt worden. Ebenso konnte in dem von uns im wässrigen Zustand gelagerten Vollblut Uracil freigesetzt werden.

4.2.4 Eignung der Markersubstanzen zur Eingrenzung des PMI

Obwohl wir, wie von MUNOZ et al. gefordert (LUCY et al. 2001, MUNOZ et al. 2001), das PMI als abhängige Variable bei der Regressionsanalyse einsetzten und somit die optimale Regressionsgleichung zur Berechnung der Leichen- liegezeit ermittelten, lieferte die Auswertung der 69 Leichenblute ernüchternde Resultate.

Bei der separaten Auswertung der Leichenblute mit gesichertem Todeszeitpunkt ($N = 39$) und der Leichenblute mit weitestgehend gesichertem Todeszeitpunkt ($N = 30$) konnten durch die ermittelten Regressionsgleichungen jeweils maximal 11% der gesamten Messwertvarianz erklärt werden. Die Regressionsgleichung, die man bei gemeinsamer Auswertung aller 69 untersuchten Blute erhielt, konnte maximal 14% der Gesamtvarianz erklären.

Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse, muss man sich vergegenwärtigen, dass es sich bei der Freisetzung von Nicotinamid, Thymin und Uracil um Degradierungsprozesse höhermolekularer Stoffe im Rahmen von Autolyse und Fäulnis handelt. Die Autolyse, ein „ohne bakterielle Beteiligung nur durch körpereigene Inhaltsstoffe“ ablaufender Prozess, ist praktisch von den heterolytischen Veränderungen z. B. durch Mikroorganismen nicht zu trennen (HENßGE und MADEA 1988d). „Durch den Verlust permeabilitätseinschränkender Membraneigenschaften kommt es zur zunehmend freien Diffusion von lysosomalen Enzymen ...“ (HENßGE und MADEA 1988d). Obwohl der postmortale Stoffwechsel dem vitalen nicht unähnlich ist und obwohl dieselben Enzyme wirksam sind, so ist doch die Regulation der Prozesse verloren gegangen (FORSTER 1986c). „...Statt Stoffwechsel erfolgt Stoffwandel unter Schwund von Energie und Substanz“ (FORSTER 1986c).

Darüber hinaus konnte für Nicotinamid unter 4.2.2 gezeigt werden, dass es durch die der Untersuchung vorausgehende Lagerung der Proben bei -20°C zu einem Konzentrationsanstieg kam. Die Nicotinamidkonzentration wird deshalb zusätzlich zum PMI und vielen anderen Faktoren auch durch den Einfriervorgang beeinflusst.

Bei den Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der Leichenzersetzung anhand verschiedener Parameter, um Informationen für die Todeszeitbestimmung zu gewinnen, liegt das größte Problem darin, dass sowohl die Autolyse, insbeson-

dere aber die Fäulnis von multiplen Faktoren beeinflusst werden. Neben der Leichenliegezeit haben z. B. die Lagerungstemperatur, die bakterielle Besiedlung und die Dauer der Agonie einen großen Einfluss nicht nur auf den zeitlichen, sondern auch auf den qualitativen Verlauf der Leichenzersetzung (HENßGE und MADEA 1988e, MADEA und HENßGE 1987, HUCKENBECK 2001a).

Die meisten dieser Faktoren beeinflussen sich dabei wiederum gegenseitig, so dass ein Netzwerk verschiedener Einflussfaktoren existiert, das in seiner Komplexität nicht überschaubar und deswegen nicht vollständig kontrollierbar ist.

So konnten GARDINER et al. z. B. durch Untersuchung der Glaskörperflüssigkeit von Hühnern zeigen, dass selbst das Lebensalter der Hühner einen Einfluss auf die postmortale Uracilkonzentration hat (GARDINER et al. 1990).

Die bakterielle Besiedlung wiederum ist nicht nur von der Umgebungstemperatur, sondern auch von der Luftfeuchtigkeit, der Luftbewegung, einer eventuellen prämortalen Antibiotika-Gabe u. a. Faktoren abhängig (HUCKENBECK 2001b). In eigenen in vitro Untersuchungen an separat gelagerten Aliquots desselben Leichenblutes, die unter exakt denselben Bedingungen bezüglich Temperatur und Dauer gelagert wurden, zeigten sich z. T. starke Unterschiede in den Markersubstanzkonzentrationen, was sich u. a. durch die unterschiedliche Verteilung von Mikroorganismen auf die Aliquots erklären lassen könnte (Anhang: 7.3 Leichenblut bei Raumtemperatur). Dieses Ergebnis bekräftigt nochmals die obigen Ausführungen, dass sich das Netzwerk der mannigfachen Einflussfaktoren einer Kontrolle entzieht.

Um so größer das PMI ist, um so weniger laufen die postmortalen Vorgänge nach festgelegten Mustern ab. Auf Grund des starken Einflusses der Temperatur auf die meisten Leichenveränderungen sorgt die zu Beginn bei fast allen Leichen uniforme Körpertemperatur trotz verschiedener Umgebungstemperaturen für annähernd gleichartige Startbedingungen (FORSTER 1986b). Bei längeren Leichenliegezeiten erlangen zunehmend die individuell

verschiedenartigen Einflussfaktoren an Bedeutung, was zur Folge hat, dass die Leichenveränderungen immer chaotischer ablaufen. Die Varianz der Ergebnisse von Untersuchungen nimmt mit steigendem PMI zu (SAUGSTAD und OLAISEN 1978, HENßGE und MADEA 1988f-h). Aus eben diesem Grund ist die Bestimmung der Leichenliegezeit bei größerem PMI bis heute nicht ausreichend genau und sicher möglich.

Von weiterführenden Untersuchungen sahen wir auf Grund des zu geringen Zusammenhanges zwischen den Markersubstanzkonzentrationen und dem PMI ab.

Das zufällig beobachtete Auftreten der Markersubstanzen in Leichenbluten, welches zur Durchführung dieser Arbeit angeregt hat, konnte bestätigt werden. Aus den eigenen Ergebnissen muss jedoch geschlossen werden, dass sich die Konzentrationsbestimmung von Nicotinamid, Thymin und Uracil nicht zur Eingrenzung der Leichenliegezeit eignet. Die von PROKOP 1966 getroffene Feststellung, dass „chemische Untersuchungen, die den Grad der Dekomposition an bestimmten Abbauprodukten ... fassen wollen, von vornherein zum Scheitern verurteilt“ sind, hat sich bezüglich der von uns untersuchten Substanzen bestätigt (PROKOP 1966).

5 Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit war es, drei zunächst unbekannte, in Leichenmaterial auftretende Stoffe zu identifizieren und zu quantifizieren sowie zu prüfen, ob ein Zusammenhang zum postmortalen Intervall existiert, der gegebenenfalls zur Bestimmung der Leichenliegezeit beitragen könnte.

Die Substanzen identifizierten wir als Nicotinamid, Thymin und Uracil. Es wurde eine auf der Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie der Dünnschichtchromatographie und Densitometrie basierende Methode zur ihrer Konzentrationsbestimmung entwickelt.

Zum Vergleich wurden Probandenblute untersucht. In fünf sofort nach der Entnahme untersuchten Probandenbluten war keine der drei Substanzen nachweisbar. In 17 Probandenbluten, die erst nach Lagerung bei -20°C untersucht wurden, konnte in 15 Fällen Nicotinamid nachgewiesen werden (mittlere Nicotinamidkonzentration = $2,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ Blut; Konzentrationsbereich: $0,0 - 4,2\text{ }\mu\text{g/ml}$), Thymin und Uracil waren nicht nachweisbar. Mit dem Welch-Test konnte gezeigt werden, dass sich durch den Vorgang des Tieffrieren auf -20°C die Nicotinamidkonzentration signifikant erhöhte.

Im Herzblut von 69 Leichen mit genau bekanntem Todeszeitpunkt wurden die Konzentrationen an Nicotinamid, Thymin und Uracil bestimmt. Alle Leichenblute waren vor der Untersuchung bei -20°C gelagert worden, da auf Grund der Probenakquirierung aus verschiedenen Instituten die sofortige Untersuchung nicht möglich war und Versuche gezeigt hatten, dass nach abgeschlossenem Tieffriervorgang die Lagerung bei -20°C die Substanzkonzentrationen nicht verändert.

Das PMI der Leichenblute reichte dabei von 10,25 bis 202,00 h. Es fanden sich Nicotinamidkonzentrationen von 0,0 - 22,0 µg/ml Blut, Thyminkonzentrationen von 0,0 - 7,8 µg/ml und Uracilkonzentrationen von 1,7 – 167,7 µg/ml.

Mit einfacher und multipler linearer Regressionsanalyse wurde der Zusammenhang zwischen den Substanzkonzentrationen und der Leichenliegezeit untersucht. Für Nicotinamid ergab sich die Regressionsgleichung $\text{PMI (in h)} = 0,95 \cdot [\text{Nicotinamid}] + 44,3$ ($R^2 = 0,010$). Für Thymin berechnete sich das PMI aus der Gleichung $\text{PMI (in h)} = 8,79 \cdot [\text{Thymin}] + 47,5$ ($R^2 = 0,137$). Die Gleichung mit Uracil lautete $\text{PMI (in h)} = 0,27 \cdot [\text{Uracil}] + 47,0$ ($R^2 = 0,056$). Das Ergebnis der multiplen linearen Regressionsanalyse entsprach exakt dem der einfachen linearen Regressionsanalyse von Thymin.

An den geringen Beträgen der Bestimmtheitsmaße ist erkennbar, dass der Zusammenhang zwischen den untersuchten Substanzkonzentrationen und dem PMI nicht stark genug ist, um für die Ermittlung der Leichenliegezeit von Nutzen zu sein. Neben dem PMI beeinflussen viele andere Faktoren die Konzentration der drei Substanzen. In Arbeiten zu diesem Thema konnten z. B. die Umgebungstemperatur und das Lebensalter als solche Faktoren aufgezeigt werden. Bei unseren Versuchen mit Probandenbluten wurde darüber hinaus der Einfluss des Tiefrierens auf die Nicotinamidkonzentration erkennbar.

Es konnte keine neue biochemische Teilmethode zur Todeszeitbestimmung entwickelt werden. Eine Substanz, anhand deren postmortalen Konzentrationsverlauf man die Leichenliegezeit abschätzen könnte, müsste von den verschiedenen Faktoren, die sich auf die Freisetzung der von uns untersuchten Substanzen auswirken, unabhängig sein. Ein Prozess wie beim Zerfall des ^{14}C -Kohlenstoffes wäre erfolgversprechend. Da bis heute ein solcher Prozess innerhalb der ersten Tage postmortem nicht bekannt ist, muss weiterhin mit den bisherigen Methoden der Todeszeitbestimmung gearbeitet werden.

6 Literaturverzeichnis

ALTHAUS L and HENßGE C (1999) Rectal temperature time of death nomogram: sudden change of ambient temperature. *For Sci Int* 99:171-178.

BERG S: Leichenzersetzung und Leichenzerstörung. In: Mueller B (Hrsg.): *Gerichtliche Medizin*. Bd. I, Springer Verlag, Berlin (1975) S.68.

BUNDESÄRZTEKAMMER (2001) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 98, Heft 42, S.2747-2759.

COE JI (1974) Post-mortem chemistry: practical considerations and a review of the literature. *J For Sci* 19:13-32.

COUDE M and KAMOUN P (1992) Organic acids in post-mortem cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta* 206:201-206.

DOERFFEL K, GEYER R und MÜLLER H (Hrsg.): *Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen*. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1994a) S. 444-452.

DOERFFEL K, GEYER R und MÜLLER H (Hrsg.): *Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen*. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1994b) S. 22-23, 507-508, 558.

DOTZAUER G (1958) Ideomuskulärer Wulst und postmortale Blutung. Dtsch Z ges gerichtl Med 46:761-771.

FORSTER B (Hrsg.): Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1986a) S.45.

FORSTER B (Hrsg.): Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1986b) S.800.

FORSTER B (Hrsg.): Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1986c) S.792.

GARDINER EE, NEWBERRY RC and KENG JY (1989) Postmortem Time and Storage Temperature Affect the Concentrations of Hypoxanthine, other Purines, Pyrimidines, and Nucleosides in Avian and Porcine Vitreous Humor. Pediatr Res 26:639-642.

GARDINER EE, NEWBERRY RC and KENG JY (1990) Avian Vitreous Humor Concentrations of Inosine, Hypoxanthine, Xanthine, Uric Acid, Uracil and Uridine as Influenced by Age and Sex: Their Relevance as Indicators of Antemortem Hypoxia. For Sci Int 47:123-127.

GLOB PV: Die Schläfer im Moor. Winkler Verlag, München (1966) S.94.

HENRY JB and SMITH FA (1980) Estimation of the postmortem interval by chemical means. Amer J For Med Path 1(4): 341-347.

HENßGE C und BRINKMANN B (1984) Todeszeitbestimmung aus der Rektaltemperatur: Mathematische Analyse von empirischem Material versus thermodynamische Modellierung. Eine kritische Falldarstellung. Archiv für Kriminologie 174:96-112.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988a) S.231-240.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988b) S.147-175.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988c) S.106-117, S.125-126.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988d) S.203.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988e) S.203-205.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988f) S.88.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988g) S.187.

HENßGE C und MADEA B: Methoden der Todeszeitbestimmung an Leichen. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck (1988h) S.205-213.

HENSSGE C, ALTHAUS L, BOLT J, FREISLEDERER A, HAFFNER HT, HENSSGE CA, HOPPE B and SCHNEIDER V (2000) Experiences with a compound method for estimating the time since death. I. Rectal temperature nomogram for time since death. *Int J Legal Med* 113:303-319.

HIRAIWA K, OHNO Y, KURODA F, SEBETAN IM and OSHIDA S (1980) Estimation of postmortem interval from rectal temperature by use of computer. *Medicine Science and Law* 20(2):115-125.

HUCKENBECK W: Experimentelle Untersuchungen zum bakteriell induzierten Alkohol- und Aminosäurenstoffwechsel im Blut der menschlichen Leiche. Verlag Dr. Köster, Berlin (2001a) S.235-236.

HUCKENBECK W: Experimentelle Untersuchungen zum bakteriell induzierten Alkohol- und Aminosäurenstoffwechsel im Blut der menschlichen Leiche. Verlag Dr. Köster, Berlin (2001b) S.18.

JAMES RA, HOADLEY PA and SAMPSON BG (1997) Determination of Postmortem Interval by Sampling Vitreous Humour. *Am J For Med Path* 18(2):158-162.

JOSEPH AEA and SCHICKELE E (1970) A general method for assessing factors controlling postmortem cooling. *J For Sci* 15(3):364-391.

KAEMPE B (1967) Interfering Substances in the Determination of Poisons in Autopsy Material: Nicotinamide, Uracil and Thymine. *Acta pharmacol et toxicol* 25:249-257.

KARLSON P, DOENECKE D und KOOLMAN J: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Thieme Verlag, Stuttgart (1994)

KLEIN A und KLEIN S: Die Todeszeitbestimmung am menschlichen Auge. Med. Diss. (B), Dresden (1978)

KRAUSE D, KLEIN A, MEIßNER D, ROITSCH E und HERRMANN WR (1971) Die Bedeutung der Kaliumkonzentration im Glaskörper menschlicher Augen für die Todeszeitbestimmung. Zschr ärztl Fortbild 65:345-348.

LÖFFLER G und PETRIDES PE: Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. Springer Verlag, Berlin(1998a) S.150-151.

LÖFFLER G und PETRIDES PE: Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. Springer Verlag, Berlin(1998b) S.594.

LÖFFLER G und PETRIDES PE: Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. Springer Verlag, Berlin(1998c) S.649.

LÖFFLER G und PETRIDES PE: Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. Springer Verlag, Berlin(1998d) S.666-667.

LUCY D, AYKROYD R and POLLARD M: Commentary on MUNOZ JI, SUÁREZ-PENARANDA JM, OTERO XL, RODRÍGUEZ-CALVO MS, COSTAS E, MIGUÉNS X and CONCHEIRO L (2001) A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous. J For Sci 46(6):1527-1528.

LUNDQUIST F (1956) Acta Med leg soc (Liège) 9:207.

MADEA B und HENSSGE C (1987) Informationswert der Kaliumkonzentration in Glaskörperflüssigkeit für die Todeszeit - Präzisionsgewinn durch Erfassung antemortaler Dysregulation? Beitr gerichtl Med 45:151-155.

MADEA B, KÄFERSTEIN H, HERMANN N and STICHT G (1994) Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid – a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. For Sci Int 65:19-31.

MALL E G: Temperaturgestützte Bestimmung der Todeszeit mit Hilfe der Methode der Finiten Elemente. Med. Diss. (B), München (2000)

MALLACH HJ (1964) Zur Frage der Todeszeitbestimmung. Berl Med 18:577-582.

MALLACH HJ und LAUDAHN G (1964) Vergleichende Untersuchungen mit enzymatischen Methoden an Vital- und Leichenbluten im Hinblick auf die Todeszeit. Klin Wschr 42:693-699.

MARSHALL TK and HOARE FE (1962) Estimating the time of death – The rectal cooling after death and its mathematical expression. J For Sci 7(1):56-81.

MUNOZ JI, SUÁREZ-PENARANDA JM, OTERO XL, RODRÍGUEZ-CALVO MS, COSTAS E, MIGUÉNS X and CONCHEIRO L (2001) A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous. J For Sci 46(2):209-214.

MUNOZ BARÚS JI, SUÁREZ-PENARANDA JM, OTERO XL, RODRÍGUEZ-CALVO MS, COSTAS E, MIGUÉNS X and CONCHEIRO L (2002) Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging. *For Sci Int* 125:67-74.

PROKOP O: *Forensische Medizin. Volk und Gesundheit Verlag, Berlin* (1966) S.55.

PROKOP O: Supravitale Erscheinungen. In: Prokop O und Göhler W: *Forensische Medizin. Volk und Gesundheit Verlag, Berlin* (1975) S.16-27.

ROBINSON DM and KELLENBERGER RE (1962) *Amer J clin Path* 38:371.

SAUGSTAD OD and OLAISEN B (1978) Post-mortem Hypoxanthine Levels in the Vitreous Humour: An Introductory Report. *For Sci Int* 12:33-36.

SCHLEYER F (1959) Über physikalische, chemische, hämatologische und histologische Methoden der Todeszeitbestimmung. *Zbl allg Path path Anat* 99:509-515.

SCHLEYER F: Determination of the Time of Death in the Early Post-mortem Interval. In: Lundquist F (Hrsg.): *Methods of Forensic Science. Bd. II, Interscience Publ, New York* (1963) S. 253-293.

SCHLEYER F (1967) Neuere Erkenntnisse über agonale und frühpostmortale chemische Vorgänge in den Körperflüssigkeiten. *Dtsch Z ges gerichtl Med* 59:48-54.

SCHLEYER F: Todeszeitbestimmung im frühpostmortalen Intervall. In: Mueller B (Hrsg.): Gerichtliche Medizin. Bd. I, Springer Verlag, Berlin (1975) S.60.

SCHMIDT G: Postmortale Veränderungen von Arzneistoffen und Giften in Organen und Körperflüssigkeiten einschließlich Neubildung von Störsubstanzen. In: Preuß R (Hrsg.): Gadamer's Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittlung der Gifte. Bd. I, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1969) S.191.

SCHOURUP K: Dodstidsbestemmelse pa grundlag av postmortelle cisternevaedskeforandringer og det postmortelle axiltemperaturfald. Med. Diss. (A) , Kopenhagen (1950)

SELLIER K (1958) Determination of the time of death by extrapolation of the temperature decrease curve. Acta Medicinae Socialis et Legalis 11:279-302.

SJÖVALL H (1951) Nord kriminaltekn Tidskr 21:1.

SUGIE H, NISHIKAWA T and FUNAO T (1995) Quantitation of nucleotides, nucleosides and bases in antemortem and postmortem bloodstains by high-performance liquid chromatography. For Sci Int 71:123-130.

TAGLIARO F, MANETTO G, CITTADINI F, MARCHETTI D, BORTOLOTTI F and MARIGO M (1999) Capillary zone electrophoresis of potassium in human vitreous humour: validation of a new method. J Chromatogr B 733:273-279.

WACHTER H und HAUSEN A: Chemie für Mediziner. Walter de Gruyter Verlag, Berlin (1985) S.32-35.

WOLTER M: Blindwerte bei der Analyse von biologischem Material in der klinischen Toxikologie mittels Dünnschichtchromatographie-Remissionsspektrometrie. Med. Diss. (A), Jena (2000)

ZEECK A, Eick S, Krone B und Schröder K: Chemie für Mediziner. Urban & Fischer, München (2000) S.54-55.

ZSAKÓ S (1916) Bestimmung der Todeszeit durch die muskelmechanischen Erscheinungen. Münch Med Wochenschr 3:82.

Zum Erstellen der Arbeit verwendete Handbücher

BÜHL A und ZÖFEL P: SPSS Version 10: Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. Addison Wesley Verlag, München (2000)

NICOL N und ALBRECHT R: Wissenschaftliche Arbeiten schreiben mit Word: Formvollendete und normgerechte Examens-, Diplom- und Doktorarbeiten. Addison Wesley Verlag, München (2000)

VOLLANDT R: Medizinische Statistik für Humanmediziner: Vorlesungsscript Wintersemester 1999/2000 der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Jena (1999)

HARMS V: Biomathematik, Statistik und Dokumentation. Harms Verlag, Kiel (1992)

7 Anhang

7.1 Tabellen

7.1.1 Stabilität der Markersubstanzen bei – 20°C

Tabelle 9: Lagerung dreier Leichenblute bei – 20°C, Nicotinamidkonzentration

| Lagerungszeit in Wochen | Nicotinamid in µg/ml Blut | | |
|-------------------------|---------------------------|--------|--------|
| | Blut 1 | Blut 2 | Blut 3 |
| 0 | 7,2 | 2,6 | 20,2 |
| 8 | 6,9 | 2,8 | 18,2 |
| 16 | 6,6 | 3,2 | 18,8 |
| 24 | 7,0 | 3,2 | 19,1 |
| 32 | 7,9 | 3,9 | 22,0 |
| 40 | 7,5 | 3,4 | 25,6 |
| 48 | 8,4 | 3,2 | 26,1 |

Tabelle 10: Lagerung dreier Leichenblute bei – 20°C, Thyminkonzentration

| Lagerungszeit in Wochen | Thymin in µg/ml Blut | | |
|-------------------------|----------------------|--------|--------|
| | Blut 1 | Blut 2 | Blut 3 |
| 0 | 0 | 0 | 5,8 |
| 8 | 0 | 0 | 5,1 |
| 16 | 0 | 0 | 4,6 |
| 24 | 0 | 0 | 5,0 |
| 32 | 0 | 0 | 6,8 |
| 40 | 0 | 0 | 5,8 |
| 48 | 0 | 0 | 6,3 |

Tabelle 11: Lagerung dreier Leichenblute bei – 20°C, Uracilkonzentration

| Lagerungszeit in Wochen | Uracil in µg/ml Blut | | |
|-------------------------|----------------------|--------|--------|
| | Blut 1 | Blut 2 | Blut 3 |
| 0 | 12,4 | 2,3 | 57,7 |
| 8 | 13,9 | 3,2 | 52,5 |
| 16 | 13,1 | 3,6 | 55,0 |
| 24 | 12,6 | 3,1 | 54,8 |
| 32 | 16,1 | 3,5 | 93,4 |
| 40 | 16,1 | 3,3 | 64,1 |
| 48 | 14,4 | 3,6 | 68,5 |

7.1.2 Markersubstanzkonzentrationen in Probandenbluten

Tabelle 12: Konzentration von Nicotinamid, Thymin und Uracil in µg/ml Probandenblut
(nach Lagerung des Probandenblutes bei – 20°C)

| Blut-Nummer | [Nicotinamid] in µg/ml Blut | [Thymin] in µg/ml Blut | [Uracil] in µg/ml Blut |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 4,1 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 4,2 | 0,0 | 0,0 |
| 3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 2,1 | 0,0 | 0,0 |
| 5 | 1,1 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | 1,1 | 0,0 | 0,0 |
| 7 | 2,5 | 0,0 | 0,0 |
| 8 | 2,3 | 0,0 | 0,0 |
| 9 | 2,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10 | 2,6 | 0,0 | 0,0 |
| 11 | 3,7 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | 3,7 | 0,0 | 0,0 |
| 13 | 1,5 | 0,0 | 0,0 |
| 14 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 15 | 0,9 | 0,0 | 0,0 |
| 16 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| 17 | 0,6 | 0,0 | 0,0 |

7.1.3 Markersubstanzkonzentrationen in Leichenbluten

Tabelle 13: PMI und Konzentrationen von Nicotinamid, Thymin und Uracil in µg/ml Blut

Herzblut von Leichen des Rechtsmedizinischen bzw. des Pathologischen
Instituts der FSU Jena (gesicherter Todeszeitpunkt, Sektionsprotokoll)

| Blut-Nummer | Todeszeit in h p.m. | [Nicotinamid] in µg/ml Blut | [Thymin] in µg/ml Blut | [Uracil] in µg/ml Blut |
|-------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 23,25 | 14,4 | 0,0 | 21,7 |
| 2 | 24,75 | 5,3 | 0,0 | 20,2 |
| 3 | 25,25 | 13,7 | 0,5 | 52,8 |
| 4 | 34,00 | 10,9 | 0,8 | 34,9 |
| 5 | 34,25 | 10,3 | 0,0 | 7,0 |
| 6 | 34,75 | 4,9 | 1,8 | 19,0 |
| 7 | 39,50 | 11,5 | 0,8 | 29,3 |
| 8 | 39,75 | 12,3 | 1,7 | 32,3 |
| 9 | 44,00 | 13,6 | 0,0 | 13,3 |
| 10 | 44,25 | 10,4 | 0,6 | 37,2 |
| 11 | 45,50 | 19,5 | 0,0 | 17,1 |
| 12 | 46,00 | 8,4 | 0,0 | 27,9 |
| 13 | 46,75 | 14,4 | 5,8 | 166,4 |
| 14 | 47,75 | 7,9 | 1,7 | 5,0 |
| 15 | 50,25 | 13,6 | 1,6 | 56,4 |
| 16 | 51,50 | 9,6 | 0,0 | 9,9 |
| 17 | 52,00 | 10,9 | 0,5 | 21,2 |
| 18 | 53,00 | 19,0 | 0,5 | 31,9 |

| Blut-Nummer | Todeszeit in h p.m. | [Nicotinamid] in µg/ml Blut | [Thymin] in µg/ml Blut | [Uracil] in µg/ml Blut |
|-------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 19 | 56,75 | 14,1 | 3,1 | 94,8 |
| 20 | 60,50 | 12,4 | 0,0 | 19,1 |
| 21 | 61,25 | 7,8 | 0,0 | 10,9 |
| 22 | 61,75 | 13,8 | 0,0 | 17,3 |
| 23 | 62,25 | 12,1 | 1,0 | 44,0 |
| 24 | 63,50 | 12,6 | 3,0 | 35,3 |
| 25 | 65,25 | 15,1 | 0,6 | 53,5 |
| 26 | 69,50 | 17,5 | 0,0 | 15,1 |
| 27 | 81,75 | 16,8 | 0,0 | 22,9 |
| 28 | 82,25 | 14,4 | 0,0 | 60,8 |
| 29 | 85,25 | 16,4 | 5,8 | 167,7 |
| 30 | 88,25 | 9,2 | 0,9 | 37,7 |
| 31 | 90,50 | 10,0 | 2,8 | 67,5 |
| 32 | 91,00 | 9,2 | 0,0 | 10,8 |
| 33 | 92,25 | 9,3 | 1,6 | 23,9 |
| 34 | 96,50 | 13,9 | 0,0 | 47,9 |
| 35 | 97,00 | 9,5 | 0,5 | 41,5 |
| 36 | 103,75 | 14,5 | 2,0 | 105,0 |
| 37 | 133,50 | 16,2 | 3,4 | 83,8 |
| 38 | 168,00 | 0,0 | 7,8 | 15,9 |
| 39 | 202,00 | 11,9 | 0,0 | 15,9 |

Tabelle 14: PMI und Konzentrationen von Nicotinamid, Thymin und Uracil in µg/ml Blut

Herzblut von Leichen des Rechtsmedizinischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München (weitestgehend gesicherter Todeszeitpunkt, Totenschein)

| Blut-Nummer | Todeszeit in h p.m. | [Nicotinamid] in µg/ml Blut | [Thymin] in µg/ml Blut | [Uracil] in µg/ml Blut |
|-------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 10,25 | 4,6 | 0,0 | 4,8 |
| 2 | 12,50 | 16,2 | 0,0 | 37,2 |
| 3 | 14,50 | 9,8 | 0,0 | 12,1 |
| 4 | 15,75 | 11,6 | 0,0 | 10,9 |
| 5 | 17,00 | 13,4 | 0,0 | 14,4 |
| 6 | 17,50 | 8,6 | 0,0 | 8,6 |
| 7 | 19,00 | 13,3 | 0,0 | 12,5 |
| 8 | 20,50 | 10,0 | 0,7 | 18,2 |
| 9 | 21,00 | 10,5 | 0,0 | 12,9 |
| 10 | 24,50 | 13,5 | 0,6 | 15,2 |
| 11 | 25,25 | 6,3 | 0,0 | 5,5 |
| 12 | 25,50 | 11,4 | 1,4 | 27,1 |
| 13 | 25,50 | 8,1 | 0,0 | 7,1 |
| 14 | 26,00 | 10,8 | 0,0 | 22,6 |
| 15 | 26,50 | 15,1 | 0,5 | 23,4 |
| 16 | 26,75 | 9,7 | 0,0 | 15,8 |
| 17 | 27,00 | 2,4 | 0,0 | 1,7 |
| 18 | 27,50 | 9,8 | 0,0 | 12,8 |
| 19 | 28,25 | 9,0 | 0,0 | 4,7 |

| Blut-Nummer | Todeszeit in h p.m. | [Nicotinamid] in µg/ml Blut | [Thymin] in µg/ml Blut | [Uracil] in µg/ml Blut |
|-------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 20 | 28,50 | 13,6 | 0,0 | 2,6 |
| 21 | 31,00 | 7,1 | 2,0 | 27,5 |
| 22 | 32,00 | 7,8 | 0,0 | 5,1 |
| 23 | 34,25 | 13,8 | 1,2 | 34,9 |
| 24 | 73,50 | 11,9 | 0,0 | 12,7 |
| 25 | 76,75 | 22,0 | 4,8 | 72,5 |
| 26 | 77,25 | 10,6 | 0,0 | 11,0 |
| 27 | 84,50 | 5,7 | 0,0 | 14,9 |
| 28 | 97,50 | 14,5 | 1,0 | 32,2 |
| 29 | 99,25 | 17,0 | 0,5 | 10,7 |
| 30 | 125,25 | 13,3 | 0,0 | 7,6 |

7.2 Probandenblute bei unterschiedlicher Lagerung

Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Um zu prüfen, ob und unter welchen Lagerungsbedingungen bei Probandenblut Nicotinamid, Thymin und Uracil nachweisbar würden, untersuchten wir von fünf Probanden Vollblut und Serum.

Für jeden Probanden wurden beide Untersuchungsmaterialien sofort nach der Blutentnahme wie unter 3.2.2 beschrieben untersucht. Das restliche Material jedes Probanden, es lag jeweils doppelt vor, wurde bei 4°C und – 20°C für 28 Tage gelagert und dann ebenfalls wie unter 3.2.2 aufbereitet.

Bei sofortiger Untersuchung von Vollblut und Serum konnte keine der Markersubstanzen nachgewiesen werden. Nicotinamid konnte bei einigen

Probanden sowohl nach vierwöchiger Lagerung bei – 20°C als auch nach vierwöchiger Lagerung bei 4°C, jedoch nur im Vollblut und nicht im Serum, nachgewiesen werden (Tabelle 15). Thymin war bei keiner Untersuchung nachweisbar (Tabelle 16). Uracil konnte nur bei einem Probanden nach Lagerung bei 4°C und ebenfalls nur im Vollblut und nicht im Serum nachgewiesen werden (Tabelle 17).

Tabelle 15: Anzahl der Probandenblute, bei denen Nicotinamid nach unterschiedlicher Lagerung nachweisbar war ($N_{\text{ges}} = 5$)

| Untersuchungszeitpunkt | Sofort | Nach 4 Wochen | Nach 4 Wochen |
|------------------------|--------|---------------|---------------|
| Lagerungstemperatur | | T = - 20°C | T = 4°C |
| Vollblut | 0 | 4 | 2 |
| Serum | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 16: Anzahl der Probandenblute, bei denen Thymin nach unterschiedlicher Lagerung nachweisbar war ($N_{\text{ges}} = 5$)

| Untersuchungszeitpunkt | Sofort | Nach 4 Wochen | Nach 4 Wochen |
|------------------------|--------|---------------|---------------|
| Lagerungstemperatur | | T = - 20°C | T = 4°C |
| Vollblut | 0 | 0 | 0 |
| Serum | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 17: Anzahl der Probandenblute, bei denen Uracil nach unterschiedlicher Lagerung nachweisbar war ($N_{\text{ges}} = 5$)

| Untersuchungszeitpunkt | Sofort | Nach 4 Wochen | Nach 4 Wochen |
|------------------------|--------|---------------|---------------|
| Lagerungstemperatur | | T = - 20°C | T = 4°C |
| Vollblut | 0 | 0 | 1 |
| Serum | 0 | 0 | 0 |

7.3 Leichenblut bei Raumtemperatur

Versuchsdurchführung und Ergebnisse

Gegenstand dieses Vorversuches war es, zu prüfen wie sich die Marker-substanzkonzentrationen während der Lagerung bei Raumtemperatur veränderten.

Drei Leichenblute kamen zur Anwendung. Das Intervall zwischen Todeseintritt und Beginn der Untersuchung (= PMI) des ersten Blutes betrug 105 h, das des zweiten und dritten Blutes 40 h. Aliquots zu 0,25 ml wurden hergestellt.

Von zwei Aliquots pro Blut führten wir sofort wie unter 3.2.2 beschrieben die Untersuchung durch. Die anderen Aliquots wurden in separaten Reagenz-gläsern bei Raumtemperatur gelagert. Die Lagerung erfolgte, um relative Temperaturkonstanz zu gewährleisten, vor Licht geschützt in einem abgeschlossenen Holzschrank (mittlere Temperatur = 24°C). Nach bestimmten Zeitintervallen wurden jeweils zwei der separat gelagerte Aliquots desselben Blutes wie unter 3.2.2 untersucht.

Interessant war, dass sich die Substanzkonzentrationen in den separat gelagerte Aliquots desselben Blutes z. T. nicht unerheblich unterschieden (Tabelle 18, Tabelle 19, Tabelle 20), obwohl die Aliquots gleichartigen Lagerungsbedingungen bezüglich Raumtemperatur und Lagerungsdauer ausgesetzt gewesen waren.

Tabelle 18: Nicotinamidkonzentration in µg/ml Blut bei Raumtemperatur-Lagerung

| | Zeit p.m. in Tagen | Zusätzliche Lage- rungsdauer in Tagen | Aliquot 1 in µg/ml | Aliquot 2 in µg/ml | MW in µg/ml |
|--------|-----------------------|--|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Blut 1 | 4,4 | 0 | 6,9 | 7,4 | 7,2 |
| | 11,4 | 7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 15,4 | 11 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 18,4 | 14 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 22,4 | 18 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Blut 2 | 1,7 | 0 | 2,8 | 2,9 | 2,9 |
| | 2,7 | 1 | 3,7 | 4,1 | 3,9 |
| | 5,7 | 4 | 3,9 | 4,0 | 4,0 |
| | 8,7 | 7 | 2,2 | 0,0 | 1,1 |
| | 12,7 | 11 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 15,7 | 14 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 19,7 | 18 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Blut 3 | 1,7 | 0 | 2,8 | 2,5 | 2,6 |
| | 2,7 | 1 | 2,0 | 1,8 | 1,9 |
| | 5,7 | 4 | 2,0 | 2,3 | 2,2 |
| | 8,7 | 7 | 2,7 | 2,6 | 2,6 |
| | 12,7 | 11 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 15,7 | 14 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 19,7 | 18 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

MW = arithmetisches Mittel aus den Konzentrationen beider Aliquots

Zeit p.m. in Tagen = PMI (in Tagen) + zusätzliche Lagerungsdauer (in Tagen)

Tabelle 19: Thyminkonzentration in µg/ml Blut bei Raumtemperatur-Lagerung

| | Zeit p.m. in Tagen | Zusätzliche Lage- rungsdauer in Tagen | Aliquot 1 in µg/ml | Aliquot 2 in µg/ml | MW in µg/ml |
|--------|-----------------------|--|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Blut 1 | 4,4 | 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 11,4 | 7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 15,4 | 11 | 1,9 | 7,5 | 4,7 |
| | 18,4 | 14 | 22,9 | 12,2 | 17,5 |
| | 22,4 | 18 | 6,3 | 2,9 | 4,6 |
| Blut 2 | 1,7 | 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 2,7 | 1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 5,7 | 4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 8,7 | 7 | 0,5 | 0,6 | 0,6 |
| | 12,7 | 11 | 1,3 | 1,0 | 1,2 |
| | 15,7 | 14 | 2,7 | 1,9 | 2,3 |
| | 19,7 | 18 | 1,1 | 5,3 | 3,2 |
| Blut 3 | 1,7 | 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 2,7 | 1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 5,7 | 4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 8,7 | 7 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | 12,7 | 11 | 1,7 | 2,1 | 1,9 |
| | 15,7 | 14 | 2,1 | 2,7 | 2,4 |
| | 19,7 | 18 | 1,5 | 1,7 | 1,6 |

MW = arithmetisches Mittel aus den Konzentrationen beider Aliquots

Zeit p.m. in Tagen = PMI (in Tagen) + zusätzliche Lagerungsdauer (in Tagen)

Tabelle 20: Uracilkonzentration in µg/ml Blut bei Raumtemperatur-Lagerung

| | Zeit p.m. in Tagen | Zusätzliche Lage- rungsdauer in Tagen | Aliquot 1 in µg/ml | Aliquot 2 in µg/ml | MW in µg/ml |
|--------|-----------------------|--|-----------------------|-----------------------|----------------|
| Blut 1 | 4,4 | 0 | 12,0 | 12,7 | 12,4 |
| | 11,4 | 7 | 15,6 | 19,3 | 17,4 |
| | 15,4 | 11 | 24,8 | 56,9 | 40,8 |
| | 18,4 | 14 | 92,0 | 81,3 | 86,7 |
| | 22,4 | 18 | 70,0 | 84,5 | 77,2 |
| Blut 2 | 1,7 | 0 | 3,0 | 3,2 | 3,1 |
| | 2,7 | 1 | 4,2 | 4,9 | 4,6 |
| | 5,7 | 4 | 5,2 | 5,2 | 5,2 |
| | 8,7 | 7 | 4,1 | 3,0 | 3,6 |
| | 12,7 | 11 | 2,7 | 3,7 | 3,2 |
| | 15,7 | 14 | 3,8 | 42,5 | 23,1 |
| | 19,7 | 18 | 7,1 | 5,6 | 6,3 |
| Blut 3 | 1,7 | 0 | 2,4 | 2,2 | 2,3 |
| | 2,7 | 1 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| | 5,7 | 4 | 2,6 | 2,6 | 2,6 |
| | 8,7 | 7 | 2,1 | 2,0 | 2,0 |
| | 12,7 | 11 | 5,7 | 4,4 | 5,0 |
| | 15,7 | 14 | 10,1 | 5,7 | 7,9 |
| | 19,7 | 18 | 3,5 | 7,6 | 5,5 |

MW = arithmetisches Mittel aus den Konzentrationen beider Aliquots

Zeit p.m. in Tagen = PMI (in Tagen) + zusätzliche Lagerungsdauer (in Tagen)

Diskussion

Bei vergleichender Betrachtung der zwei separat gelagerten Aliquots desselben Blutes, die zeitgleich untersucht wurden, waren z. T. deutliche Konzentrationsunterschiede der Markersubstanzen erkennbar, obwohl gleiche Lagerungsbedingungen im Bezug auf Temperatur und Zeit bestanden hatten.

Als Ursache für die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen kommt u. a. die unterschiedliche mikrobielle Kontamination in Frage.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass es sehr schnell zu bakterieller Kontamination von Herzblut kommt (BERG 1975). 12 h p.m. ist das Ergebnis einer Bakterienkultur häufig (GLOB 1966), 36 h p.m. immer positiv (ROBINSON and KELLENBERGER 1962). Das von uns in diesem Vorversuch untersuchte Herzblut war der Leiche frühestens 40 h p.m. entnommen worden. Von einer bakteriellen Kontamination ist deshalb auszugehen.

Bei der Aliquotierung der Blute wurden die vorhandenen Mikroorganismen zufällig auf die Aliquots verteilt. Die unterschiedlichen Keimausgangszahlen und Stoffwechselleistungen verschiedener Spezies sind Faktoren, die mit zur unterschiedlichen Zersetzung der Blutproben beigetragen haben könnten, vor allem, da die Mikroorganismen bei Raumtemperatur optimale Bedingungen zum Wachstum hatten.

7.4 Bestimmung der Nachweisgrenzen

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen untersuchten wir Lebendblute (N = 10) sofort nach deren Entnahme. Die Leerwerte für Nicotinamid, Thymin und Uracil wurden bestimmt, indem die Remission in den Bereichen der Chromatographiebahn gemessen wurde, in denen sich die Peaks von Nicotinamid, Thymin und Uracil befinden (Abbildung 5, Tabelle 21).

Der Anstieg der jeweiligen Kalibrationskurve wurde näherungsweise mit Hilfe des ersten Punktes der Kalibrationskurve bestimmt (Abbildung 18). Da für die Messungen mehrere DC-Platten verwendet wurden, ermittelten wir aus den Kalibrationskurvenanstiegen aller verwendeter DC-Platten (N = 10) den Mittelwert und rechneten mit diesem weiter.

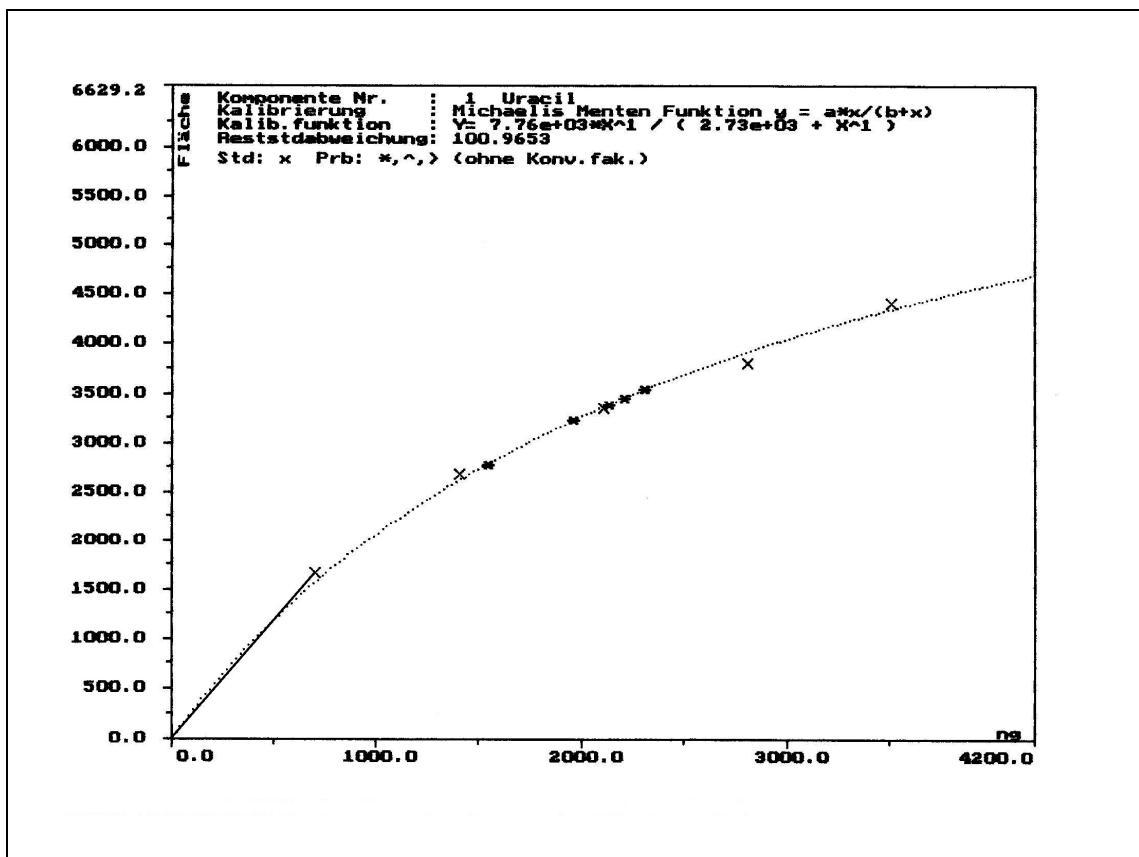


Abbildung 18: Kalibrationskurve am Beispiel von Uracil mit eingezeichnetem Anstieg

Die Abschätzung der Nachweisgrenze für die auf der DC-Platte befindliche Stoffmenge erfolgte anhand der Formel in Abbildung 7 (=Nachweisgrenze in ng (auf Platte)).

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze im Ausgangsuntersuchungsmaterial musste dieser Wert nun noch entsprechend der bei unserem Konzentrationsbestimmungsverfahren auftretenden Verdünnung und den mittleren Stoffverlusten bei der Extraktion korrigiert werden (Abbildung 19, Abbildung 20, Tabelle 22).

$$\text{Nachweisgrenze in } \mu\text{g/ml (Untersuchungsmaterial)} = \frac{\text{Nachweisgrenze in ng (auf Platte)} * 5}{0,25 \text{ ml} * 1000 * \text{Ausbeute (des Extraktionsverfahrens)}}$$

Abbildung 19: Formel zur Berechnung der Nachweisgrenze bezogen auf das Untersuchungsmaterial (allgemein)

$$\begin{aligned} \text{Nachweisgrenze in } \mu\text{g/ml (Untersuchungsmaterial, Uracil)} &= \frac{20,1 \text{ ng} * 5}{0,25 \text{ ml} * 1000 * 0,63} \\ &= 0,638 \mu\text{g/ml} \sim 0,6 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Abbildung 20: Formel zur Berechnung der Nachweisgrenze bezogen auf das Untersuchungsmaterial am Beispiel von Uracil

Mit dem Faktor 5 muss multipliziert werden, da wir zum Untersuchungsmaterial 5 ml Ethylacetat zusetzten, jedoch nur 1 ml des Gemisches nach Ausschütteln eindampften (Abbildung 19). Durch 0,25 ml wird dividiert, weil 0,25 ml Untersuchungsmaterial eingesetzt wurden. Durch die Ausbeute, welche Tabelle 5 zu entnehmen ist (Ausbeute für 0,00 ml Wasserzusatz), muss dividiert werden, um den bei der Extraktion auftretenden Stoffverlust zu berücksichtigen.

Tabelle 21: Leerwerte im Bereich von Nicotinamid, Thymin und Uracil bei Lebendbluten (N = 10) in gehaltsproportionaler Signalintensität (= Remissionskalenteilen)

| Nummer des Lebendblutes | Leerwert bei Nicotinamid | Leerwert bei Thymin | Leerwert bei Uracil |
|-------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 60,7 | 6,7 | 18,7 |
| 2 | 25,5 | 4,4 | 23,7 |
| 3 | 49,1 | 3,5 | 13,7 |
| 4 | 55,7 | 2,3 | 27,0 |
| 5 | 62,6 | 46,5 | 3,3 |
| 6 | 60,4 | 25,1 | 7,4 |
| 7 | 46,8 | 21,3 | 49,7 |
| 8 | 46,8 | 4,6 | 18,9 |
| 9 | 54,2 | 8,4 | 28,2 |
| 10 | 33,7 | 6,2 | 8,6 |
| Standardabweichung | 12,1 | 14,1 | 13,4 |

Tabelle 22: Nachweisgrenze von Nicotinamid, Thymin und Uracil und zu deren Errechnung notwendige Daten

| | Nicotinamid | Thymin | Uracil |
|--|-------------|--------|--------|
| Mittelwert der Anstiege (der Kalibrationskurven, N = 10) | 1,98 | 2,87 | 2,00 |
| Ausbeute ¹ | 0,65 | 0,68 | 0,63 |
| Nachweisgrenze in µg/ml (im Untersuchungsmaterial) | 0,5 | 0,4 | 0,6 |

Die Ausbeute¹ wurde Tabelle 5 entnommen (0,00 ml Wasserzusatz).

Danksagung

Für die Vergabe des Themas, die konstruktive Kritik und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit danke ich aufrichtig Frau Prof. Dr. med. A. Klein und Herrn PD Dr. rer. nat. U. Demme.

Für ihre Unterstützung bei der Sammlung der Leichenblute danke ich besonders Herrn Prof. Dr. med. D. Katenkamp, Herrn Bock, Herrn Prof. Dr. med. W. Eisenmenger, Frau Dr. med. Hatz und Herrn Klein.

Mein weiterer Dank für die Hilfe bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials gilt Herrn Dr. rer. nat. R. Vollandt.

Lebenslauf

Daten zur Person

| | |
|---------------|-------------------|
| Name | Juliane Schelhorn |
| Geburtstag | 10.05.1979 |
| Geburtsort | Jena |
| Familienstand | Ledig |

Schul Ausbildung

| | |
|-------------|---------------------------------|
| 1985 - 1991 | Grundschule Erich-Weinert, Jena |
| 1991 - 1997 | Carl-Zeiss-Gymnasium, Jena |
| 1997 | Abitur |

Hochschulausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 1997 - 2003 | Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität, Jena |
| 1999 | Physikum |
| 2000 | 1. Staatsexamen |
| 2002 | 2. Staatsexamen |
| 2003 | 3. Staatsexamen |
| Praktisches Jahr | |
| 10.2002 - 02.2003 | Innere, Kreiskrankenhaus Rudolstadt |
| 02.2003 - 04.2003 | Chirurgie, Northern General Hospital, Sheffield, Großbritannien |
| 04.2003 - 05.2003 | Chirurgie, FSU Jena |
| 06.2003 - 09.2003 | Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, FSU Jena |

Jena, 20. November 2003

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:
 - Prof. Dr. med. A. Klein
 - PD Dr. rer. nat. U. Demme
 - Dr. rer. nat. R. Vollandt
- ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 20. November 2003